

**Relevanz der Ubiquitinierung für die
Resektionsregulation in G1-Phase-Zellen
an schwerioneninduzierten
DNA-Doppelstrangbrüchen**

**vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt**

zur Erlangung des Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Dissertation

von M.Sc. Carina Janine Barent

Erstgutachter: Prof. Dr. Markus Löbrich

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Gisela Taucher-Scholz

Darmstadt 2020

Barent, Carina Janine: Relevanz der Ubiquitinierung für die Resektionsregulation in G1-
Phase-Zellen an schwerioneninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen

*Relevance of ubiquitination for the regulation of break-end resection in G1-
phase cells at heavy-ion-induced DNA double-strand breaks*

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt

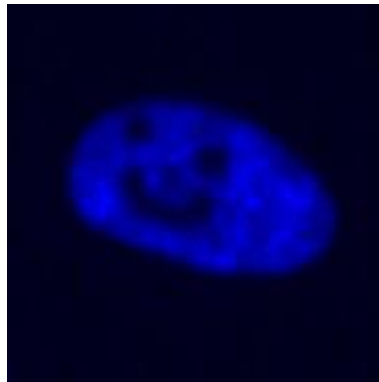
Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2020

URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-114392

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2020

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International

<https://creativecommons.org/licenses/>



*You may never know what results come of your actions,
but if you do nothing, there will be no results.*

- Mahatma Gandhi -

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XIV
Formelverzeichnis	XIV
Abkürzungsverzeichnis	XV
Zusammenfassung	XX
Summary	XXII
1. Einleitung	1
1.1. Physikalische Eigenschaften und biologische Auswirkungen ionisierender Strahlung	2
1.2. Zellzyklus	8
1.3. Regulation der DNA-Schadensantwort über posttranslationale Modifikation durch Ubiquitinierung	10
1.4. DNA-Schadenserkennung	13
1.5. DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturwege	14
1.6. Regulatorische Mechanismen der Wahl des DSB-Reparaturwegs	18
1.7. Zielsetzung	20
2. Material und Methoden	22
2.1. Material	22
2.1.1. Geräte	22
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	23
2.1.3. Chemikalien	24
2.1.4. Puffer und Lösungen	26
2.1.5. Zellkulturmedien und Zusätze	28
2.1.6. Biochemische Kits	29
2.1.7. Primäre Antikörper	29
2.1.8. Sekundäre Antikörper	31

2.1.9.	siRNA	31
2.1.10.	Plasmide	32
2.1.11.	Oligonukleotide / Primer	32
2.1.12.	Inhibitoren	33
2.1.13.	Antibiotika	33
2.1.14.	Enzyme	34
2.1.15.	Software	34
2.1.16.	Zelllinien	35
2.2.	Methoden	37
2.2.1.	Zellkulturtechnik	37
2.2.1.1.	Zellpassage	37
2.2.1.2.	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen	38
2.2.1.3	Inhibitorbehandlung	38
2.2.1.4	Überlebenskurve	39
2.2.2	Vorbereitungen für die Bestrahlung	41
2.2.2.1	Vorbereitung der alpha-Kammern für die Bestrahlung an der alpha-Quelle	41
2.2.2.2	Vorbereitung der Zellen in Magazinen für die Bestrahlung am Linearbeschleuniger	42
2.2.2.3	Vorbereitung der Zellen in Magazinen für die Bestrahlung am SIS	43
2.2.3	Bestrahlung der Zellen	43
2.2.3.1	Röntgenbestrahlung	43
2.2.3.2	Alpha-Teilchen-Bestrahlung	44
2.2.3.3	Schwerionenbestrahlung am Linearbeschleuniger UNILAC	45
2.2.3.4	Schwerionenbestrahlung am Synchrotron SIS 18	46
2.2.3.5	Laserbestrahlung	47
2.2.4	Immunzytochemische Methoden	48
2.2.4.1	Lebendzellfärbung mit Hoechst	48
2.2.4.2	Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA)	48

2.2.4.3	EdU-Markierung replizierender Zellen und EdU-Click-Reaktion	48
2.2.4.4	Immunfluoreszenzfärbung	49
2.2.4.5	Ku80-Immunfluoreszenzfärbung	50
2.2.4.6	Kernfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	50
2.2.5	Mikroskopie	50
2.2.5.1	Immunfluoreszenzmikroskopie	50
2.2.5.2	MetaCyte	51
2.2.6	Molekularbiologische Methoden	52
2.2.6.1	SiRNA-Transfektion mittels HiPerFect	52
2.2.6.2	Plasmid-Transfektion mittels jetPRIME	52
2.2.6.3	DNA/RNA-Extraktion	53
2.2.6.4	DNA-Verdau und Ligation	53
2.2.6.5	Transformation in <i>E.coli NEB10β</i>	54
2.2.6.6	Plasmid-Isolierung durch Maxi-Prep	54
2.2.6.7	Mycoplasmentest	54
2.2.6.8	Analyse eines PCR-Produkts mittels Agarosegelelektrophorese	55
2.2.6.9	Generierung einer <i>Knockout</i> -Zelllinie mittels CRISPR/Cas9	55
2.2.7	Biochemische Methoden	57
2.2.7.1	Zelllysate nach Lämmli	57
2.2.7.2	Zelllysate für Immunpräzipitation	57
2.2.7.3	Immunpräzipitation / Ubiquitin- <i>Pulldown</i> mittels <i>TUBEs</i>	57
2.2.7.4	Vorbereitung der Zellen für die Sortierung am <i>Cell Sorter</i>	58
2.2.7.5	Zellsortierung am <i>Cell Sorter</i>	58
2.2.7.6	Proteinbestimmung nach Lowry	61
2.2.7.7	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	62
2.2.7.8	Westernblot	62
2.2.7.9	Immunologischer Nachweis und Detektion	63

3.	Ergebnisse	65
3.1.	Ubiquitinierung – eine posttranslationale Modifikation zur Regulation der DNA-End-Resektion in der DNA-Schadensantwort	65
3.2.	Funktion der Ubiquitin-Ligase RNF8 nach hoch-LET-Bestrahlung in G1	65
3.2.1.	Depletion von RNF8 hat keine Auswirkungen auf die RPA-Foci-Bildung nach Bestrahlung mit alpha-Teilchen	68
3.2.2.	Erhöhte Anzahl an RPA-Foci in 53BP1-depletierten Zellen nach alpha-Teilchen-Bestrahlung	70
3.3.	Relevanz der Ubiquitin-Ligase RNF138 für die DNA-End-Resektion in humanen G1-Phase-Zellen nach Ionenbestrahlung	72
3.3.1.	Vergleichbare Expression von RNF138 in G1- und G2-Phase-Zellen	72
3.3.2.	Generierung einer RNF138-KO-Zelllinie zur Untersuchung der Relevanz von RNF138 für die Resektion komplexer DSBs	73
3.3.3.	Beeinträchtigte Ubiquitinierung von Proteinen in RNF138-defizienten Zellen insbesondere nach Ionenbestrahlung	75
3.3.4.	Verminderte Phosphorylierung des DNA-Einzelstrangbindepoteins RPA in RNF138-KO-Zellen nach Bestrahlung mit 30 Gy Röntgen	78
3.3.5.	RNF138-Depletion verringert die Anzahl an RPA-positiven Zellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen	79
3.3.6.	Depletion von UBE2D1 hat lediglich in S/G2-Phase-Zellen und Bestrahlung mit Kohlenstoffionen einen Einfluss auf die Resektion	81
3.4.	Einfluss des Resektionsantagonisten Ku80 – Zielprotein der Ubiquitin-Ligase RNF138 – auf die DNA-End-Resektion nach Induktion komplexer Schäden in G1	84
3.4.1.	Entfernung des Resektionsantagonisten Ku80 vom Schaden unabhängig der Präsenz von RNF138 nach Ionenbestrahlung	84
3.4.2.	Auswirkungen einer DNA-PK-Inhibition zu späten Zeitpunkten nach Bestrahlung auf die DNA-DSB-Reparatur ioneninduzierter DSBs	86
3.4.3.	Bedeutung der ATPase p97/VCP für die Resektion komplexer Schäden in G1	87
3.4.4.	Interaktion von Ku80 mit der ATPase p97/VCP	89
3.4.5.	RNF138 und RNF8 als mögliche Faktoren die Proteinmodifikation durch Ubiquitinierung von Ku80 nach Bestrahlung mit Eisenionen zu beeinflussen	91
3.5.	Beitrag des RNF138-Target CtIP an der Resektionsregulation in G1 nach Ionenbestrahlung	93
3.5.1.	Verminderte Rekrutierung des Resektionsfaktors CtIP an komplexe DSBs in RNF138-depletierten Zellen	93

3.5.2.	Interaktion des Resektionsfaktors CtIP mit der E3 Ubiquitin-Ligase RNF138	96
3.5.3.	RNF138 ist für die Ubiquitinierung von CtIP in G1-Phase-Zellen essentiell	99
3.6.	Auswirkungen der Ubiquitinierung durch RNF138 auf die DNA-DSB-Reparatur und das klonogene Zellüberleben	102
3.6.1.	Bedeutung der Ubiquitin-Ligase RNF138 für die DSB-Reparatur nach Induktion komplexer Schäden durch Ionenbestrahlung	102
3.6.2.	Folge der RNF138-Depletion auf die DNA-DSB-Reparatur in bereits Artemis-defizienten Zellen nach Induktion von DSBs unterschiedlicher Komplexität	105
3.6.3.	RNF138-defiziente Zellen reagieren im Vergleich zu WT-Zellen leicht sensitiver auf die Induktion komplexer Schäden durch Ionenbestrahlung	109
4.	Diskussion	113
4.1.	Ubiquitinierung – eine posttranslationale Modifikation zur Regulation der DNA-End-Resektion in der DNA-Schadensantwort	113
4.2.	Funktion der Ubiquitin-Ligase RNF8 nach hoch-LET-Bestrahlung in G1 und Auswirkungen einer RNF8-Defizienz auf die DNA-End-Resektion	114
4.3.	Relevanz der Ubiquitin-Ligase RNF138 für die DNA-End-Resektion in humanen G1-Phase-Zellen nach Ionenbestrahlung	115
4.4.	Einfluss des Resektionsantagonisten Ku80 – Zielprotein der Ubiquitin-Ligase RNF138 – auf die DNA-End-Resektion nach Induktion komplexer Schäden in G1	118
4.4.1.	Bedeutung der ATPase p97/VCP für die Resektion komplexer Schäden in G1	118
4.4.2.	Auswirkungen der DNA-PK-Inhibition zu späten Zeitpunkten nach Bestrahlung auf die DNA-DSB-Reparatur ioneninduzierter DSBs	120
4.4.3.	Entfernung des Resektionsantagonisten Ku80 vom Schaden unabhängig der Präsenz von RNF138 nach Ionenbestrahlung	122
4.4.4.	Rolle der Ubiquitinierung von Ku80 durch die Ubiquitin-Ligasen RNF138 und RNF8 nach Bestrahlung mit Eisenionen	123
4.5.	Beitrag des RNF138-Target CtIP an der Resektionsregulation in G1 nach Ionenbestrahlung	124
4.5.1.	Verminderte Rekrutierung des Resektionsfaktors CtIP an komplexe DSBs in RNF138-depletierten Zellen	125
4.5.2.	Interaktion des Resektionsfaktors CtIP mit der E3 Ubiquitin-Ligase RNF138	126
4.5.3.	RNF138 ist für die Ubiquitinierung von CtIP in G1-Phase-Zellen essentiell	127
4.6.	Auswirkungen der Ubiquitinierung durch RNF138 auf die DNA-DSB-Reparatur und das klonogene Zellüberleben	128

4.6.1.	Bedeutung der Ubiquitin-Ligase RNF138 für die DSB-Reparatur nach Induktion von DSBs unterschiedlicher Komplexität	128
4.6.2.	RNF138-defiziente Zellen reagieren im Vergleich zu WT-Zellen leicht sensitiver auf die Induktion komplexer Schäden durch Bestrahlung mit Kohlenstoffionen	132
5.	Literaturverzeichnis	136
6.	Anhang	151
6.1.	Sequenzierungsergebnisse	151
6.2.	Lebenslauf	155
6.3.	Publikationen und Tagungsbeiträge	156
6.3.1.	GSI Annual Reports:	156
6.3.2.	Tagungsbeiträge	156
6.3.3.	Auszeichnungen	156
6.4.	Danksagung	157
	Ehrenwörtliche Erklärung	159

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Darstellung der Chromatinstruktur	1
Abbildung 2:	Interaktionsmöglichkeiten von Photonen mit Materie	2
Abbildung 3:	Flächendosisprofil für 2 Gy Photonenstrahlen im Vergleich zu 2 Gy Kohlenstoffionen	3
Abbildung 4:	Vergleich des Tiefendosisprofils von Photonen und Ionen verschiedener Energien.	4
Abbildung 5:	Schematische Darstellung eines direkten und indirekten DNA-Schadens	5
Abbildung 6:	Schematische Darstellung verschiedener Arten von DNA-Schäden	6
Abbildung 7:	Klonogenes Zellüberleben von Hamsterzellen, die mit Röntgen im Vergleich zu verschiedenen Ionen unterschiedlicher Energien bestrahlt wurden	7
Abbildung 8:	Schema des eukaryontischen Zellzyklus und dessen Kontrollpunkte	9
Abbildung 9:	Übersicht der DNA-Schadensantwort (<i>DNA damage response = DDR</i>)	10
Abbildung 10:	Schematische Darstellung des mehrstufigen Ubiquitinierungsprozesses	11
Abbildung 11:	Schema des Ubiquitin-Proteins.	11
Abbildung 12:	Darstellung des Proteasoms	12
Abbildung 13:	Vereinfachte Darstellung der beiden Haupt-Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismen der klassischen Nicht-homologen Endverknüpfung (c-NHEJ) und der Homologen Rekombination (HR)	
Abbildung 14:	Modell der DSB-Reparatur über eine alternative Form der Endverknüpfung (alt-EJ)	17
Abbildung 15:	Modell des resektionsabhängigen c-NHEJ in G1	18
Abbildung 16:	In Abhängigkeit des LET nimmt der Anteil an Resektions-positiven Zellen in beiden Zellzyklusphasen zu	20
Abbildung 17:	Schematische Darstellung des Fucci-Zellzyklus sowie des Fucci-Konstrukts	36
Abbildung 18:	Darstellung der Anregungs- und Emissionsmaxima der beiden im Fucci-System verwendeten fluoreszierenden Proteine Kusabira-Orange2 (mKO2) und Azami-Grün1 (mAG1)	37
Abbildung 19:	Aufnahme gefärbter Kolonien eines Überlebens-experiments	40
Abbildung 20:	Schema der Vorbereitung der Edelmetallringe für die alpha-Teilchen-Bestrahlung	41
Abbildung 21:	Magazin für die Bestrahlung am Linearbeschleuniger UNILAC.	42
Abbildung 22:	Foto und schematische Darstellung des Aufbaus für die Schrägbestrahlung am SIS18	43
Abbildung 23:	Schema einer Röntgenröhre	44
Abbildung 24:	Foto und schematische Darstellung der alpha-Teilchen-Bestrahlungsapparatur.	45

Abbildung 25: Schema der Senkrecht- und Schrägbestrahlung mit Schwerionen	45
Abbildung 26: Halterung für die Schrägbestrahlung am UNILAC.	46
Abbildung 27: Schematischer Aufbau zur Funktionsweise eines <i>Cell Sorters</i>	59
Abbildung 28: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers	60
Abbildung 29: Gaten lebender Einzelzellen mit Hilfe der Messung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts im <i>Cell Sorter</i> anhand spezieller graphischer Auftragungen.	60
Abbildung 30: Bestimmung von G1- und G2-Phase- Hela.S-Fucci-Zellen anhand ihrer beider stabil integrierten zellzyklusspezifischen Fluoreszenzmarker im S3 <i>Cell Sorter</i> von Biorad.	61
Abbildung 31: Schematischer Aufbau eines Westernblots	62
Abbildung 32: Schema der Immundetektion und Mechanismus der HRP-Chemilumineszenzreaktion	63
Abbildung 33: Während die Proteinmodifikation durch Ubiquitinierung im Fall der WT-Zellen von unbestrahlten über Röntgen bis hin zu Eisen-bestrahlten Zellen zunimmt, konnte nach Depletion der Ubiquitin-Ligase RNF8 und Bestrahlung mit Röntgen oder Eisenionen keine verstärkte Ubiquitinierung beobachtet werden	68
Abbildung 34: In beiden Zellzyklusphasen hat die Depletion von RNF8 nach alpha-Teilchen-Bestrahlung keinen Einfluss auf die Anzahl der RPA-Foci pro Nukleus	69
Abbildung 35: Höhere Anzahl an RPA-Foci in beiden Zellzyklusphasen nach 53BP1-Depletion	71
Abbildung 36: RNF138 wird in G1-Phase-Zellen exprimiert	73
Abbildung 37: U2OS-Klon 1A und Hela.S-Fucci-Klon 2C4 zeigen quasi keine RNF138-Proteinexpression	73
Abbildung 38: Schematische Darstellung der möglichen Cas9-Nuklease-Reaktionen zur Überprüfung der Zygotität und Agarosegelelektrophorese-Ergebnisse der untersuchten U2OS- und Hela.S-Fucci-RNF138-KO-Klone	75
Abbildung 39: Nach 48-stündigem siRNF8 kd ist die Proteinexpression der Ubiquitin-Ligase RNF8 deutlich reduziert	76
Abbildung 40: Während die Modifikation von Proteinen durch Ubiquitinierung im Fall der WT-Zellen von unbestrahlten über röntgen- bis hin zu eisenbestrahlten Zellen zunimmt, konnte nach Depletion einer der beiden Ubiquitin-Ligasen RNF138 oder RNF8 und Bestrahlung mit Röntgen oder Eisenionen keine verstärkte Ubiquitinierung beobachtet werden	77
Abbildung 41: In RNF138-KO-Zellen wurde nach Bestrahlung mit 30 Gy Röntgen im Vergleich zu WT-Zellen weniger RPA phosphoryliert	78
Abbildung 42: Unabhängig der Zellzyklusphase führt die Depletion von RNF138 nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen zu einem geringeren Anteil an RPA-positiven Zellen.	81
Abbildung 43: Während in S/G2-Phase-Zellen der <i>Knockdown</i> von UBE2D1 nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen zu einem geringeren Anteil an RPA-positiven Zellen führt, hat ein UBE2D1 kd in G1-Phase-Zellen keine Auswirkungen auf den Anteil an RPA-positiven Zellen	83

Abbildungung 44:	Sowohl in WT als auch RNF138-defizienten Zellen sind 1 h nach Bestrahlung mit Kohlenstoff- bzw. Eisenionen signifikant weniger Ku80-positive Zellen auszumachen als 15 min nach Bestrahlung.	85
Abbildungung 45:	Kein DSB-Reparaturdefekt in U2OS-WT- und U2OS-RNF138-KO- G1-Phase-Zellen nach DNA-PK-Inhibition zu späten Zeitpunkten nach Ionenbestrahlung.	87
Abbildungung 46:	Eine Konzentration von 50 µM NMS-873 erwies sich als effektiv, um das pRPA-Level deutlich zu senken.	88
Abbildungung 47:	Geringere Anzahl an RPA-Foci in beiden Zellzyklusphasen nach Inhibition von p97/VCP	89
Abbildungung 48:	P97/VCP interagiert mit Ku80 strahlungsunabhängig in G1-Phase-Zellen.	90
Abbildungung 49:	In WT- und RNF138-KO-Zellen nahm die Ubiquitinierung von Ku80 nach Bestrahlung mit Röntgen zu, wohingegen die Proteinmodifikation in RNF8-depletierten Zellen eher abnahm.	92
Abbildungung 50:	Die Herunterregulation von RNF138 nach Ionenbestrahlung führt in beiden Zellzyklusphasen zu einem geringeren Anteil CtIP-positiver Zellen.	94
Abbildungung 51:	Sowohl in asynchronen als auch speziell G1-Phase-Zellen wird CtIP in RNF138-KO-Zellen signifikant weniger an Laser-induzierte Schäden rekrutiert	96
Abbildungung 52:	Unabhängig von Bestrahlung interagiert RNF138 mit CtIP in G1-Phase-Zellen.	97
Abbildungung 53:	RNF138-GFP wird an Laser-induzierte Schäden rekrutiert. Auch das neu generierte RNF138-FLAG-Plasmid zeigt die Rekrutierung von RNF138 binnen Sekunden.	98
Abbildungung 54:	Unabhängig von der Bestrahlung mit Röntgen oder Eisenionen konnte in RNF138-KO-Zellen drastisch in der G1-Phase weniger ubiquitiniertes CtIP nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich nach Bestrahlung in den WT-Zellen eine verstärkte Ubiquitinierung von CtIP	101
Abbildungung 55:	Leichter Reparaturdefekt in G1- und G2-Phase-RNF138-KO-Zellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen im Vergleich zu WT-Zellen.	104
Abbildungung 56:	G2-Phase-RNF138-KO und Rad51-inhibierte WT-Zellen zeigten 10 h nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen einen vergleichbaren DSB-Reparaturdefekt.	105
Abbildungung 57:	DSB-Reparaturdefekt nach Röntgenbestrahlung in Artemis-defizienten G1-Phase-Zellen kann durch zusätzlichen <i>Knockdown</i> von RNF138 aufgehoben werden	108
Abbildungung 58:	Vermindertes klonogenes Überleben in G1- und S/G2-Phase RNF138-KO- im Vergleich zu WT-Zellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen..	110
Abbildungung 59:	Schematische Darstellung von DSB-Reparaturkinetiken induziert durch niedrig-LET-Strahlung wie Röntgen (durchgezogene Linie) bzw. hoch-LET-Strahlung wie alpha-Teilchen oder Ionenbestrahlung (gestrichelte Linie) in der G1- (links) und G2-Zellzyklusphase (rechts).	120
Abbildungung 60:	Modell der resektionsfördernden Wirkung von RNF138 und Reparatur über alt-EJ nach Induktion komplexer Schäden in G1	135

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Charakteristika der verwendeten Ionen am Linearbeschleuniger UNILAC	45
Tabelle 2:	Charakteristika der verwendeten Eisenionen am Schwerionensynchrotron SIS 18	47
Tabelle 3:	Lösungen und Mengen des EdU-Click-Reaktionscocktails. Die in dieser Tabelle aufgeführten Lösungen wurden in den angegebenen Mengen der Reihenfolge nach gemischt und auf die zu färbenden Zellen gegeben.	49
Tabelle 4:	Vergleich der Dosis [Gy] bei 10% klonogenem Zellüberleben (D_{10}) und der relativen biologischen Wirksamkeit (RBE) nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenqualitäten.	111
Tabelle 5:	Parameter der Überlebensfits: Vergleich der α - [Gy ⁻¹] und β -Werte in [Gy ⁻²] nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenqualitäten. α - und β -Werte der Röntgen- und Eisenionenbestrahlung stammen vom linear-quadratischen Fit (vgl. Formel 10), wohingegen der α -Wert der Kohlenstoffionenbestrahlung vom linearen Fit (vgl. Formel 11) herrührt.	111

Formelverzeichnis

Formel 1:	Definition der Energiedosis [D].	3
Formel 2:	Definition der maximalen Reichweite (R_{\max}) von Sekundärelektronen in μm in Abhängigkeit der Energie [E]	4
Formel 3:	Definition des Linearen Energietransfers [LET] mit:	4
Formel 4:	Formel zur Berechnung der Dosis von Ionen in Gy in Abhängigkeit der Fluenz und des LET.	5
Formel 5:	Definition der relativen biologischen Wirksamkeit (RBE).	7
Formel 6:	Linear-quadratisches Modell des Zellüberlebens [S].	8
Formel 7:	Definition des auszusäenden Volumens I [ml]	39
Formel 8:	Definition des Zellüberlebens S	40
Formel 9:	Definition des relativen Überlebens S_{relativ}	40
Formel 10:	Linearquadratischer Fit zum fitten von Überlebenskurven mit $x = \text{Dosis}$; $A = \text{Koeffizient für den linearen Anteil}$ und $B = \text{Koeffizient für den quadratischen Anteil des Zellsterbens}$.	40
Formel 11:	Linearer Fit mit $Y_0 = \text{Y-Achsenabschnitt}$ und $m = \text{Steigung}$	40

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
53BP1	p53 bindendes Protein (<i>p53 binding protein</i>)
AK	Antikörper
alt-EJ	Alternative Endverknüpfung
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
BER	<i>base excision repair</i>
BLM	Helikase Bloom
β-ME	β-Mercaptoethanol
BRCA1	<i>BReast CAncer protein 1</i>
BRCA2	<i>BReast CAncer protein 2</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bp	Basenpaar (<i>base pair</i>)
C	Kohlenstoff (<i>carbon</i>)
Cdk	Cyclin-anhängige Kinase (<i>cyclin dependent kinase</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
Cdt1	<i>Chromatin licensing and DNA replication factor 1</i>
CENP-F	Centromer bindendes Protein F (<i>centromere binding protein F</i>)
c-NHEJ	klassisches NHEJ (<i>classical NHEJ</i>)
crRNA	CRISPR RNA
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CtIP	<i>CtBP interacting protein</i>
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DDR	DNA-Schadensantwort (<i>DNA damage response</i>)
D-Loop	D-Schleife (displacement-loop)
DMEM	Dulbecco's minimales essentielles Medium (<i>Dulbecco's minimal essential medium</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)

Abkürzung	Bezeichnung
DNase	Desoxyribonuklease
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase (<i>DNA-dependent protein kinase</i>)
DNA-PK _{cs}	katalytische Untereinheit der DNA-abhängige Proteinkinase (<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>)
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
dsDNA	doppelsträngige DNA (<i>double stranded DNA</i>)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylene diamine tetra acetic acid</i>)
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
EGFP	erweitertes grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
ESB	Einzelstrangbruch
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
Exo1	Exonuclease 1
F	Fluenz
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>FSC = forward scatter</i>)
fwd	<i>forward</i>
gRNA	<i>guide RNA</i>
γH2AX	an Serin 139 phosphoryliertes Histon 2AX
HR	Homologe Rekombination
GeV	Gigaelektronenvolt
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Glc	Glukose (<i>Glucose</i>)
Glu	Glutamat
Gy	Gray
HPV18	humane Pappilomviren 18
HR	Homologe Rekombination (<i>homologous recombination</i>)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)

Abkürzung	Bezeichnung
hTERT	Humane Telomerase Reverse Transkriptase (<i>human telomerase reverse transcriptase</i>)
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
IR	Ionisierende Strahlung (<i>ionizing radiation</i>)
J	Joule
kb	Kilobasen (<i>kilobase</i>)
kd	<i>Knockdown</i>
kDa	Kilodalton
keV	Kiloelektronenvolt
kg	Kilogramm
KO	<i>Knockout</i>
LET	Linearer Energietransfer
mAG1	monomeres Azami-Grün 1
mCherry	Rot fluoreszierendes Protein (<i>red fluorescent protein</i>)
MDC1	<i>mediator of DNA damage checkoint protein 1</i>
MeV	Megaelektronenvolt
mKO2	monomeres Kusabira-Orange 2
MMEJ	Mikrohomologie vermittelte Endverknüpfung (<i>microhomology mediated end joining</i>)
Mre11	<i>Meiotic recombination protein 11</i>
MRN-Komplex	MRE11/Rad50/NBS1-Komplex
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Nbs1	<i>Nijmegen breakage syndrome 1</i>
NEAA	nicht essenzielle Aminosäuren (<i>non-essential amino acid</i>)
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung (<i>non-homologous end joining</i>)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
p	nach (<i>post</i>)
PARP1/PARP2	Poly- [ADP-Ribose-] Polymerase 1 / 2
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBS ^{-/-}	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺

Abkürzung	Bezeichnung
PBS-T	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} mit Tween 20
PE	Plattierungseffizienz (<i>plating efficiency</i>)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
Plk3	<i>Polo-like kinase 3</i>
rev	<i>reverse</i>
PFA	Paraformaldehyd
PtIP	<i>PAX transcription activation domain interacting protein</i>
PTM	posttranslationale Modifikation
Rad50	<i>radiation protein 50</i>
Rad51	<i>radiation protein 51</i>
Rad52	<i>radiation protein 52</i>
RBE	relative biologische Wirksamkeit (<i>relative biological effectiveness</i>)
RIF1	<i>Rap1-interacting factor</i>
RING	<i>really interesting new gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNF8	<i>RING finger protein 8</i>
RNF138	<i>RING finger protein 138</i>
RNF168	<i>RING finger protein 168</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RPA	<i>replication protein A</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>standard error of the mean</i>)
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDSA	<i>synthesis dependent strand annealing</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single-stranded DNA</i>)
crRNA	<i>CRISPR RNA</i>
gRNA	<i>guide RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>

Abkürzung	Bezeichnung
SIS	Schwerionensynchrotron
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>SSC = side scatter</i>)
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single stranded DNA</i>)
TAE	Tris-Acetet-EDTA
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TBS-T	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20 (<i>Tris buffered saline supplemented with Tween 20</i>)
tracrRNA	<i>trans-activating crRNA</i>
TUBE	<i>tandem ubiquitin binding entities</i>
Triton-X-100	Polyethylenglycol-mono[p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl]-ether
Tris Base	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit
UIM	<i>Ubiquitin interacting motif</i>
UNILAC	Linearbeschleuniger (<i>Universal Linear Accelerator</i>)
UV	Ultraviolett
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VCP	<i>Valosin-containing protein</i>
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
WCL	Gesamtzelllysate (<i>whole cell lysate</i>)
WT	Wildtyp (<i>wildtype</i>)
XLF	<i>XRCC4 like factor</i>
XRCC1	<i>X-ray repair cross-complementing protein 1</i>
XRCC4	<i>X-ray repair cross-complementing protein 4</i>
ZNF	<i>Zinc-finger domain</i>
ZZ	Zellzahl

Zusammenfassung

Infolge endogener und exogener Einflüsse kommt es jeden Tag zu Schäden an der DNA, dem Träger der gesamten genetischen Information. Der DNA-Doppelstrangbruch (DSB) gilt hierbei als schwerwiegendster DNA-Schaden, infolgedessen von der Zelle Signalkaskaden eingeleitet werden, um die entstandenen Schäden über verschiedene Reparaturmechanismen zu beheben. Ein wichtiger Mechanismus zur Regulation der DNA-Schadensantwort (*DNA damage response* = *DDR*) ist die posttranslationale Modifikation (PTM) von Proteinen durch Ubiquitinierung. Neben den beiden Haupt-DSB-Reparaturmechanismen, der spezifisch für S/G2 resektionsabhängigen Homologen Rekombination (HR) und der stetig verfügbaren klassischen Variante der Nicht-homologen Endverknüpfung (*classical non-homologous end joining* = *c-NHEJ*), besitzt die Zelle zudem die Möglichkeit DSBs während des gesamten Zellzyklus resektionsabhängig über alternative Wege der Endverknüpfung (alt-EJ) oder den resektionsabhängigen Weg des c-NHEJ zu reparieren. Während sich die HR einer homologen Matrize als Vorlage zur Reparatur bedient und daher fehlerfrei vonstattengeht, kommt es sowohl beim klassischen NHEJ (c-NHEJ) als auch bei alternativen Wegen der Endverknüpfung (alt-EJ) häufig zu kleineren Insertionen oder Deletionen, wodurch die Wahrscheinlichkeit für chromosomale Aberrationen deutlich erhöht ist. Die Wahl des Reparaturwegs wird durch den Schritt der DNA-End-Prozessierung durch Resektion entscheidend beeinflusst. Veröffentlichungen zeigten, dass mit steigendem linearen Energietransfer (*linear energy transfer* = LET) und damit steigender DNA-Schadenskomplexität die DSB-Reparatur nicht nur in S/G2, sondern auch in G1 vermehrt resektionsabhängig verläuft.

Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Regulation der DNA-End-Resektion in G1-Phase-Zellen nach Induktion komplexer DSBs genauer zu untersuchen. Da veröffentlichte Studien belegten, dass für die DDR und auch Resektion essentielle Proteine in der S/G2-Phase durch Ubiquitinierung reguliert werden, wurde bei den durchgeführten Untersuchungen ein besonderes Augenmerk auf die posttranslationale Modifikation durch Ubiquitinierung als möglichen Resektionsregulator gelegt.

Die Relevanz dieser Form der Modifikation für die DDR nach Induktion von DNA-Schäden durch Bestrahlung bestätigten Ubiquitin-*Pulldown*-Analysen, in denen deutlich zu erkennen war, dass nach Bestrahlung mit Röntgen und vor allem hoch-LET Eisenionenbestrahlung Proteine vermehrt ubiquitiniert wurden. Für S/G2 war bekannt, dass die E3 Ubiquitin-Ligase RNF138 Resektion fördert, indem einerseits der Resektionsantagonist Ku80 infolge dessen Ubiquitinierung durch RNF138 vom Schaden entfernt und exzessivere Resektion ermöglicht wurde. Andererseits wurde beschrieben, dass die Rekrutierung des Resektionsfaktor CtIP durch dessen Ubiquitinierung ebenfalls durch RNF138 erleichtert wird.

Eine siRNA-basierte Herunterregulation sowie der komplette *Knockout* der Ubiquitin-Ligase RNF138 demonstrierte die Wichtigkeit von RNF138 für die Resektion in beiden Zellzyklusphasen, G1 und S/G2, da die Anzahl an Resektions- (RPA-) positiven Zellen nach Induktion komplexer Schäden in RNF138-depletierten Zellen deutlich verringert war.

Untersuchungen zum RNF138-Zielprotein Ku80 offenbarten, dass der Resektionsantagonist Ku80 nach Induktion komplexer DSBs ungeachtet der Verfügbarkeit von RNF138 und der Zellzyklusphase von der Schadensstelle entfernt wird. Resektions- und Ubiquitin-*Pulldown*-Analysen in RNF138-depletierten Zellen

deuteten in diesem Zusammenhang vielmehr auf eine Beteiligung von RNF8 bei der Resektionsregulation in G1 durch Ubiquitinierung von Ku80 hin.

Studien zum RNF138-Target CtIP zeigten nach Induktion komplexer Schäden durch Ionen- sowie Laserbestrahlung eine deutlich verringerte Rekrutierung des Resektionsfaktors an DSBs nicht nur in RNF138-depletierten S/G2-, sondern auch in G1-Phase-Zellen. Zudem war mittels Ubiquitin-*Pulldown*-Analysen in RNF138-KO-Zellen kein CtIP in seiner ubiquitinierten Form nachzuweisen. Dies belegte, dass CtIP auch in G1-Phase-Zellen ein Zielprotein von RNF138 ist. Somit spielt die posttranslationale Modifikation durch Ubiquitinierung auch bei der Regulation der Resektion in G1-Zellen eine wichtige Rolle.

Abschließende DSB-Reparatur- sowie Zellüberlebensstudien belegten eine Relevanz der E3 Ubiquitin-Ligase RNF138 für die DSB-Reparatur und das klonogene Zellüberleben nach niedrig-energetischer hoch-LET Kohlenstoffionenbestrahlung (Primärenergie 11,4 MeV/u; LET: 168 keV/μm). Der Vergleich von DSB-Reparaturanalysen durch Bestrahlung mit anderen Strahlenqualitäten induzierter DSBs stellte eine Bedeutung von RNF138 für die DSB-Reparatur sowie das klonogene Zellüberleben mit steigender Komplexität der induzierten Schäden heraus.

Zusammenfassend kann demnach festgehalten werden, dass die Ubiquitin-Ligase RNF138 für die Ubiquitinierung des Resektionsfaktors CtIP auch in G1 nach Induktion komplexer Schäden wichtig ist, dass sich Auswirkungen einer RNF138-Defizienz auf die DSB-Reparatur und das klonogene Zellüberleben jedoch erst nach Induktion sehr komplexer Schäden wie durch Kohlenstoffionenbestrahlung (Primärenergie: 11,4 MeV/u; LET: 168 keV/μm) erkennen lassen.

Wissend, dass ioneninduzierte, komplexe DSBs unabhängig von der Zellzyklusphase vermehrt resektionsabhängig repariert werden und die Ubiquitin-Ligase RNF138 in beiden Zellzyklusphasen für die DNA-End-Resektion in seiner Funktion CtIP zu ubiquitinieren von entscheidender Bedeutung ist, könnte die Inhibition der Ubiquitin-Ligase ein aussichtsreicher Ansatzpunkt für die Radiotumorthera pie mit Schwerionen darstellen. Während durch Bestrahlung mit Schwerionen im Bereich des Normalgewebes wenig Dosis freigesetzt und Schäden geringer Komplexität hervorgerufen werden, wird der Hauptteil der Dosis im sog. *Bragg-Peak* im Zielgewebe, dem Tumor, appliziert. Folglich entstehen im Tumorgewebe komplexe Schäden an der DNA, die im Gegensatz zu den weniger komplexen Schäden im umliegenden Normalgewebe resektionsabhängig über CtIP repariert werden müssen, was wiederum die Verfügbarkeit der Ubiquitin-Ligase RNF138 erfordert. Die RNF138-Inhibition könnte somit gezielt das Überleben der Tumorzellen negativ beeinflussen und als Inhibitor des Ubiquitin-Proteasom-Systems in der Tumorthera pie in Kombination mit Schwerionenbestrahlung Anwendung finden.

Summary

Every day the carrier of all the genetic information, the DNA, gets damaged by exogenous and endogenous factors. The most severe lesions are DNA double-strand breaks (DSBs). In order to repair these damages by different repair mechanisms, signal cascades are activated. An important regulator of the DNA damage response (DDR) is the posttranslational modification (PTM) of proteins by ubiquitination. Besides the two main DSB repair mechanisms, the resection-dependent homologous recombination (HR) in S/G2 and the classical non-homologous end joining (c-NHEJ) that is available throughout the entire cell cycle, cells have the opportunity to repair DSBs resection dependent in all cell-cycle phases *via* alternative end-joining pathways or the resection dependent c-NHEJ. HR depends on a homologous template to repair the damage and is hence is error-free. Repair by c-NHEJ or alt-EJ pathways on the other hand frequently leads to small insertions or deletions that increases the probability of chromosomal aberrations. The repair pathway choice is decisively influenced by the DNA-end processing by resection. Publications revealed, that upon induction of complex DSBs and irradiation with increasing linear energy transfer (LET) DSBs increasingly become subject to resection in S/G2 as well as in G1-phase.

Therefore, the resection regulation in G1 upon induction of complex lesions was studied in more detail in the presented work. As earlier studies showed that the posttranslational modification by ubiquitination plays a critical role in DDR and break-end resection in S/G2 cells, the focus of this work on resection regulation in G1 cells was on ubiquitination.

The relevance of the protein modification by ubiquitination for the DDR was verified by an ubiquitin-*Pulldown* analysis upon induction of DNA lesions by irradiation with X-rays or iron ions that showed an increased fraction of ubiquitinated proteins after irradiation, especially with high-LET iron ions. It is known that the E3 ubiquitin ligase RNF138 stimulates resection in S/G2 by ubiquitination and removal of the resection antagonist Ku80 on the one hand. On the other hand, RNF138 facilitates the recruitment of the resection factor CtIP by ubiquitination.

SiRNA-mediated *Knockdown* and RNF138 *Knockout* analyses revealed the importance of RNF138 for the DNA-end resection in both cell cycle phases, G1 and G2, as the fraction of resection (RPA-) positive cells was clearly reduced in RNF138-depleted G1 cells upon induction of complex DSBs.

Studies on Ku80 indicated that Ku80 gets removed from break sites upon induction of complex lesions, but RNF138 did not seem to be the only factor to ubiquitinate Ku80 as the resection antagonist was removed even in RNF138-KO cells. In fact a participation of RNF8 was suggested by studies on resection and ubiquitin-*Pulldown* analysis in RNF8-depleted cells.

Studies on the RNF138 target CtIP showed a reduced fraction of CtIP-positive cells upon carbon-ion irradiation in RNF138-depleted G1 cells. Moreover ubiquitin-*Pulldown* analysis in RNF138-KO cells indicated a modification by ubiquitination of CtIP by RNF138. Hence, resection is regulated by ubiquitination of the resection factor CtIP by RNF138 in G1-phase cells as well.

DSB repair as well as the clonogenic cell survival studies upon high-LET carbon-ion irradiation of lower energies (primary energy: 11.4 MeV/u; LET 186 keV/μm) pointed out that the DSB repair and the clonogenic cell survival of RNF138-deficient cells was impaired. In comparison, upon irradiation with other radiation

qualities like X-rays or high energetic iron-ions no effect could be observed. Consequently, RNF138 seems to be important upon induction of DSBs of high complexity.

Taken together, the E3 ubiquitin ligase RNF138 was revealed to be important for the ubiquitination and the following recruitment of the resection factor CtIP to DSBs upon induction of complex lesions even in G1-phase cells. An impact on cell survival or DSB repair after irradiation was only observed upon induction of DSBs of high complexity.

Since repair of ion-induced complex DSBs runs increasingly resection-dependent and the ubiquitin ligase RNF138 is important for the ubiquitination and recruitment of the resection factor CtIP in G1- and G2-phase, this inhibition of RNF138 could be a possibility for the combined tumor therapy with heavy-ions. Whereas upon irradiation with heavy-ions the normal, healthy tissue receives less dose and exhibits DNA lesions of lower complexity, the main part of the energy is deposited in the Bragg-Peak in the target volume, the tumor. As a consequence, contrary to the less complex lesions in the normal tissue, many DNA lesions of high complexity are formed in the tumor volume that require resection dependent repair *via* CtIP and RNF138. Thus, inhibition of RNF138 could specifically affect the cell survival of tumor cells and be applicable in the tumor therapy in combination with heavy-ion irradiation.

1. Einleitung

Der Körper eines Menschen besteht aus schätzungsweise 4×10^{13} Zellen (Bianconi, Piovesan *et al.* 2013), die verschiedenste Funktionen einnehmen. Trotz unterschiedlichster Funktionen besitzt jede Zelle die gleiche genetische Information, die im Zellkern auf der Desoxyribonukleinsäure (DNA = *deoxyribonucleic acid*) kodiert liegt. Die DNA ist ein Polymer bestehend aus einem Zucker-Phosphat-Rückgrat und den vier Basen Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin. Über Wasserstoffbrückenbindungen paaren sich die komplementäre Basen, Adenin und Thymin sowie Cytosin und Guanin und bilden mit einem zweiten, in entgegengesetzter Richtung verlaufenden, Zucker-Phosphatgerüst eine sog. Doppelhelix (Alberts, Bray *et al.* 2005). Eine Base zusammen mit einem Zucker- und Phosphatanteil wird hierbei als Nukleotid bezeichnet. Die Doppelhelixstruktur organisiert sich um Histonoktamere, bestehend auf je zwei H2A, H2B, H3 und H4 Histonen (Stavnezer, Guikema *et al.* 2008). Diese Verbindung aus Nukleotiden gewunden um ein Histonoktamer wird wiederum Nukleosom genannt und bildet die Chromatinstruktur aus. Liegt das Chromatin dicht gepackt vor wird dies als Heterochromatin bezeichnet, wohingegen lockere Strukturen Euchromatin genannt werden (Jansen und Verstrepen 2011) (Abbildung 1).

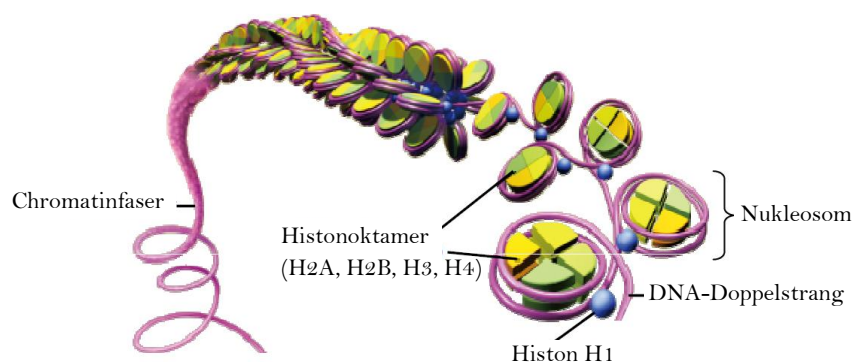


Abbildung 1: Darstellung der Chromatinstruktur. Die DNA-Doppelhelix ist um Histonoktamere bestehend aus je zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4, gewickelt. Dieser Komplex aus DNA und Histonen nennt man Nukleosom. Das Histon 1 (H1) markiert hierbei den Punkt, an dem sich die DNA um das Histonoktamer windet. Insgesamt bildet sich eine in sich gedrehte Chromatinfaser aus. <https://d3uigcfkiiww0g.cloudfront.net/2015/09/DNA-Makrostruktur.jpg> (Stand: 13.10.19 18:48 Uhr)

Da wie zuvor erwähnt die DNA den Träger der gesamten genetischen Information darstellt, ist es für die Zelle von außerordentlicher Wichtigkeit die Integrität der DNA zu erhalten und Schädigungen zu vermeiden, da diese zum Tod der Zelle oder zur Entartung und Krebsbildung führen kann (Ghosal und Chen 2013). Bei DNA-schädigenden Faktoren werden endogene zelluläre Prozesse und exogene Einflüsse unterschieden. Unter endogenen Abläufen versteht man z.B. oxidativen Stress und Prozesse wie Meiose oder V(D)J-Rekombination, wohingegen ionisierende Strahlung zu den von außen auf die DNA einwirkenden, exogenen Elementen zählt. Heutzutage sind ionisierende Strahlung wie Röntgen- und Schwerionenbestrahlung Gegenstand der Tumorthherapie (Kraft 1998), wobei die Therapie mit Schwerionen zwei wesentliche Vorteile gegenüber der konventionellen Strahlentherapie bietet. Einerseits zeichnet sie sich durch eine höhere relative biologische Wirksamkeit (*relative biological effectiveness* = *RBE*) aus, die sich insbesondere bei strahlenresistenten und tief im Gewebe gelegenen Tumoren auszeichnet. Andererseits kann eine hohe Dosis gezielt im Tumor deponiert und gleichzeitig das umliegende Normalgewebe geschont werden (Kraft 1990, Kramer, Weyrather *et al.* 2003).

Daher ist es von enormer Wichtigkeit Auswirkungen ionisierender Strahlung und speziell jene der Bestrahlung mit schweren Ionen auf humanes Gewebe und Zellen weiter zu erforschen. Dies war das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit. Im Folgenden werden hierfür zunächst die physikalischen Eigenschaften ionisierender Strahlung mit einem besonderen Augenmerk auf die Schwerionenbestrahlung näher erläutert.

1.1. Physikalische Eigenschaften und biologische Auswirkungen ionisierender Strahlung

Strahlungsarten werden nach ihrer Fähigkeit, Elektronen aus der Atomhülle des bestrahlten Elements herauszulösen in ionisierende und nichtionisierende Strahlung eingeteilt. Unter ionisierender Strahlung versteht man Strahlenarten, deren Energie groß genug ist, um die Bindungsenergie eines Elektrons zu aufzubringen und somit das Anziehungspotential des Kerns zu überwinden. Dieser Prozess wird als Ionisation bezeichnet. Wird ein Elektron durch Energiezufuhr auf ein höherenergetisches Niveau, in der Regel in eine höhere Schale, angehoben, nennt man dies Anregung. Generell wird zwischen dünn ionisierender Strahlung wie Photonen- oder Gammastrahlung und dicht ionisierender Strahlung wie Teilchenstrahlung (Elektronen, Neutronen, Positronen, alpha-Teilchen oder Schwerionen) unterschieden. Röntgenstrahlen wirken erst ab höheren Energien von etwa 124 Elektronenvolt (eV) ionisierend (Hall und Giaccia 2006). Teilchenstrahlung ist Bestandteil der natürlich vorkommenden kosmischen Strahlung, kann aber auch künstlich in Beschleunigeranlagen wie beispielsweise an der GSI (*Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung Darmstadt*) erzeugt werden.

In Abhängigkeit der Photonenenergie treten verschiedene Formen von Interaktionen auf. Die drei Phänomene sind schematisch in Abbildung 2 dargestellt (Krieger 2017).

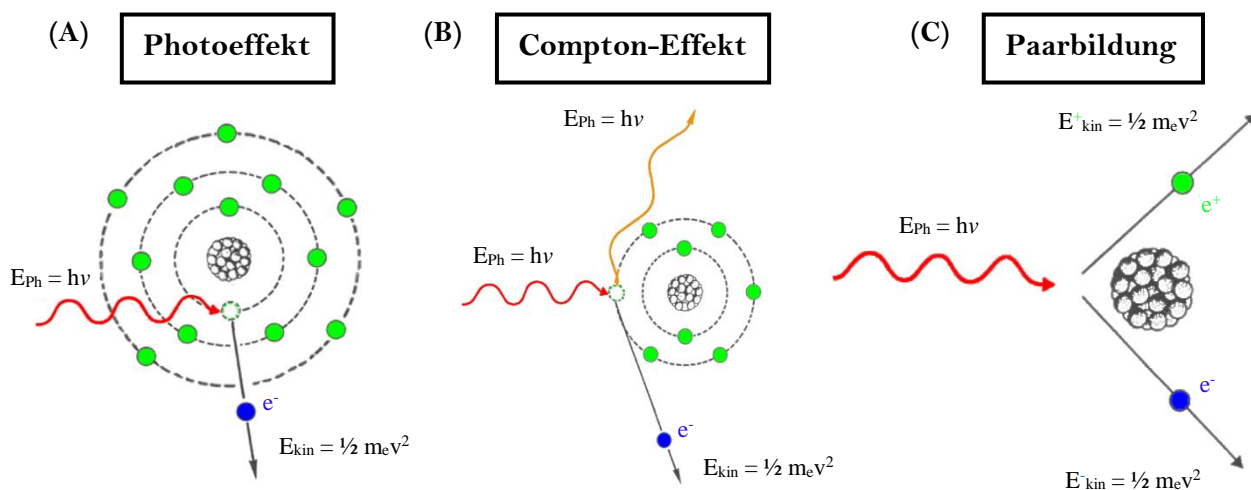


Abbildung 2: Interaktionsmöglichkeiten von Photonen mit Materie. Photoelektrischer Effekt (A). Compton-Effekt (B). Paarbildungseffekt (C) mit E_{ph} = Energie des Photons; E_{kin} = kinetische Energie; h = Planckkonstante; ν = Frequenz; m = Masse; v = Geschwindigkeit; e^- = Elektron; e^+ = Positron (modifiziert nach www.onmeda.de/lexika/strahlenmedizin/; Stand 09.10.19 16:13 Uhr).

Bei niedrigen Photonenenergien unter 1 MeV tritt vorwiegend der Photoelektrische Effekt auf, wobei ein Photon mit einem Elektron mit hoher Bindungsenergie wechselwirkt und die gesamte Energie des Photons auf das Elektron übertragen wird. Infolgedessen wird das Elektron aus der Atomhülle herausgeschlagen und nimmt

seinerseits weitere Ionisationen vor. Das im Inneren der Atomhülle herausgeschlagene Elektron wird durch eines der freien Außenelektronen ersetzt und die Energiedifferenz wird als elektromagnetische Strahlung freigesetzt.

Bei mittleren Photonenenergien zwischen 1 und 10 MeV ist der Compton-Effekt vorherrschend. Hierbei findet die Interaktion mit einem Außenelektron statt, wodurch dieses aus der Atomhülle herausgeschlagen wird. Ein Teil der kinetischen Energie wird dabei auf das Elektron übertragen und das Photon mit verringerter Energie gestreut, sodass beide, das herausgeschlagene Sekundärelektron und das Photon, weitere Ionisationen zur Folge haben können. Das dritte Phänomen der Paarbildung tritt überwiegend bei hohen Photonenenergien über 10 MeV auf. Dieser Vorgang beschreibt die Umwandlung eines Photons im elektrischen Feld in ein Elektron und ein Positron, die aufgrund ihrer hohen kinetischen Energie weitere Ionisationen vornehmen können.

Neben der Photonenenergie spielt auch die Art der interagierenden Materie eine Rolle. Je höher die Ordnungszahl des bestrahlten Elements, desto größer die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion. Infolge von Teilchenstrahlung finden so lange Ionisationsereignisse entlang ihrer Spur durch das bestrahlte Material statt, bis die notwendige Energie für Interaktionen nicht mehr gegeben ist. Während bei Photonenstrahlung Ionisationen räumlich gleichmäßig über die bestrahlte Fläche verteilt auftreten, finden sich nach Teilchenstrahlung Ionisationen vorwiegend entlang ihrer Spur durch die Materie. Das Flächendosisprofil dünn-ionisierender Röntgen- im Vergleich zu dicht-ionisierender Ionenstrahlung ist schematisch in Abbildung 3 ersichtlich.

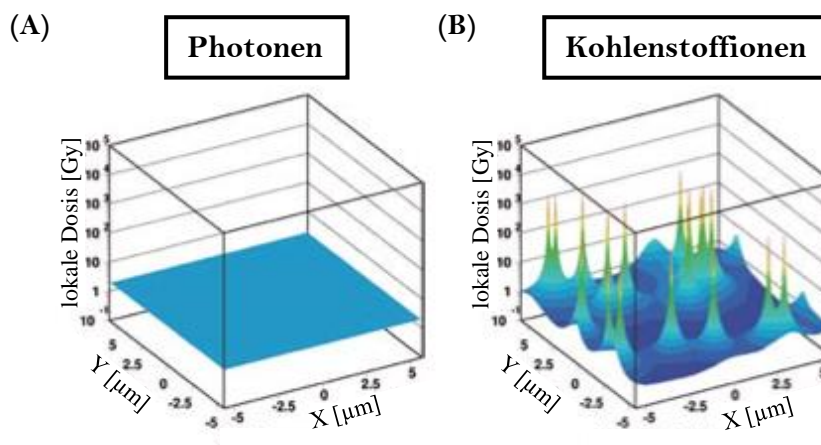


Abbildung 3: Flächendosisprofil für 2 Gy Photonenstrahlen (A) im Vergleich zu 2 Gy Kohlenstoffionen (B). Während bei Röntgenstrahlen eine homogene Dosisverteilung über die gesamte Fläche der bestrahlten Materie vorliegt, wird die Energie der Kohlenstoffionen hauptsächlich entlang der Spur des Ions abgegeben. Daher finden sich in diesem Fall lokal hohe Dosen umgeben von Bereichen mit nahezu keiner Dosisdisposition (modifiziert nach Krämer, Weyrather et al. 2003)

Die in der Materie deponierte Gesamtenergie wird als Energiedosis (D) bezeichnet und beschreibt die aufgenommene Energie (E) pro Masseneinheit (m) des absorbierenden Materials in Gray (Gy) (Formel 1). Ein Gy entspricht dabei der Deposition von 1 Joule [J] in einem Kilogramm [kg].

$$D [Gy] = \frac{E [J]}{m [kg]}$$

Formel 1: Definition der Energiedosis [D].

Nach außen hin nimmt die Dosis einer Ionenspur ab, weshalb die Dosis im Zentrum am höchsten ist. Die Reichweite von Sekundärelektronen ist dabei von der Energie des Ions abhängig und nimmt mit der Energie dessen zu. Die maximale Reichweite der Sekundärelektronen (delta-Elektronen) ist dabei wie folgt definiert:

$$R_{max} [\mu m] = 0,05 \times E^{1,7} [MeV/u]$$

Formel 2: Definition der maximalen Reichweite (R_{max}) von Sekundärelektronen in μm in Abhängigkeit der Energie $[E]$.

Niedrig-energetische Ionen weisen daher eine geringere Reichweite der sekundären Elektronen auf als hoch-energetische. Daher wird Ionenstrahlung über ihren Linearen Energietransfer (*linear energy transfer* = LET) charakterisiert. Der LET beschreibt die deponierte Energie pro Wegstrecke und ist von der Energie und der Ladung des Teilchens abhängig (Bethe 1930, Bloch 1933) (Formel 3).

$$LET \left[\frac{keV}{\mu m} \right] = \frac{E [keV]}{d [\mu m]} \propto \frac{Z_{eff}^2}{\beta^2}$$

Formel 3: Definition des Linearen Energietransfers [LET] mit:

$$E = \text{Energie}; d = \text{Wegstrecke}; Z_{eff} = \text{effektive Ladung}; \beta = \frac{v}{c}$$

(v = Geschwindigkeit des Ions im Medium; c = Lichtgeschwindigkeit)

Photonen- und Teilchenstrahlung unterscheiden sich zudem in ihrem Tiefendosisprofil. Bei Photonen wird die höchste Dosis in Abhängigkeit ihrer Energie wenige Zentimeter nach dem Eindringen in die Materie abgegeben und nimmt mit zunehmender Tiefe immer weiter ab (Abbildung 4A).

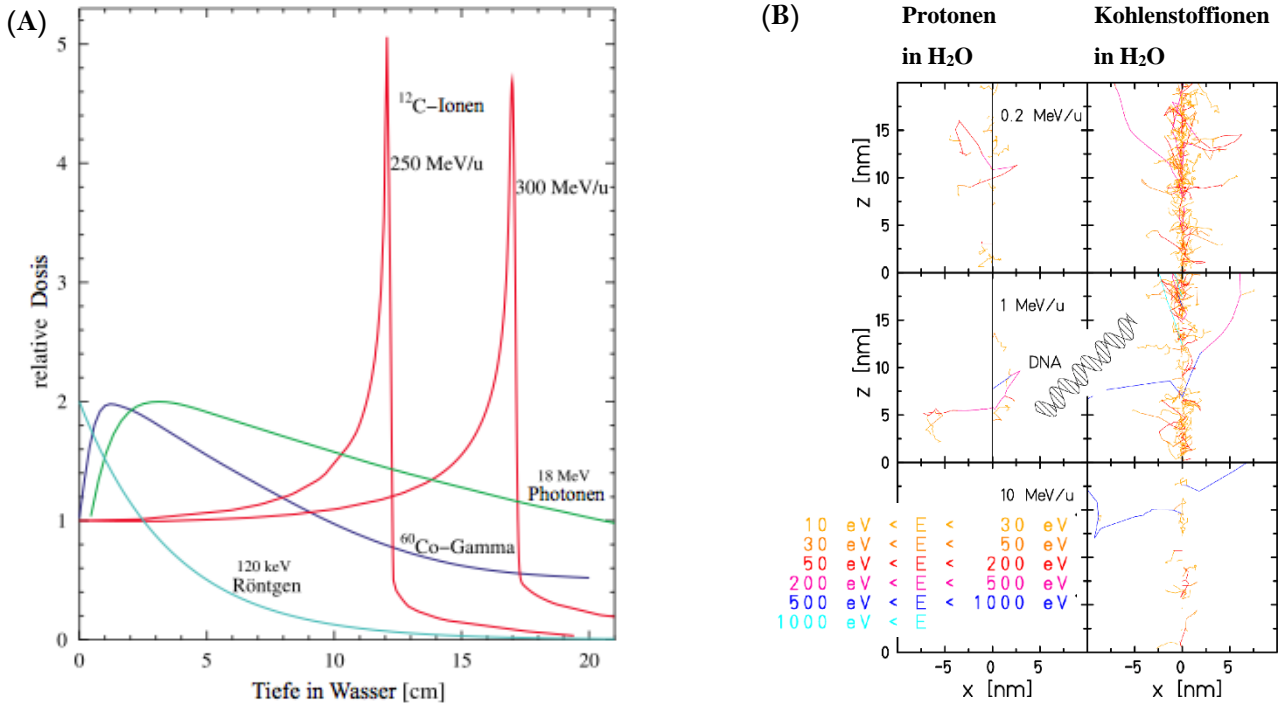


Abbildung 4: Vergleich des Tiefendosisprofils von Photonen und Ionen verschiedener Energien. Während Photonen die meiste Energie kurz nach dem Eindringen in die Materie deponieren, zeigen Ionen ein invertiertes Tiefendosisprofil (A). Der Punkt der höchsten Dosisdisposition wird als *Bragg-Peak* bezeichnet. Die Tiefenlage des *Bragg-Peaks* hängt von der Energie der Teilchen ab (B). Je geringer die Geschwindigkeit und Energie bzw. höher die Ladung eines Ions, desto dichter treten Ionisationen auf. Mit steigender Energie nimmt die Reichweite der Ionen zu. Die dargestellte DNA-Doppelhelix dient dem Größenvergleich (modifiziert nach Kraft 2008).

Hochenergetische Teilchen hingegen geben zunächst wenig Energie an die Materie ab, da die Geschwindigkeit der Teilchen zu Beginn sehr hoch ist und daher selten Interaktionen auftreten. Nach und nach interagiert das Ion immer häufiger mit Molekülen in seiner Umgebung, die Energie und Geschwindigkeit nimmt rasch ab, sodass die Dosisdeposition stark ansteigt. Höherenergetische Ionen dringen dabei weiter in das Gewebe ein als solche mit niedrigerer Energie, weshalb sich die Bestrahlung mit Ionen insbesondere zur Behandlung von tief im Gewebe liegenden Tumoren eignet. Die Tiefenlage des *Bragg-Peaks* kann dabei durch Regulation der Energie der Ionen angepasst werden, sodass dieser im zu bestrahlenden Tumorgewebe liegt. Nach Erreichen des Punktes der höchsten Dosisdeposition, dem sog. *Bragg-Peak*, verringert sich die effektive Ladung durch Elektronenaufnahme, die Geschwindigkeit und Dosis nehmen ab und das Ion wird abgestoppt (Abbildung 4B). Aufgrund der geringen Dosisdeposition vor und nach dem *Bragg-Peak* bietet die Ionenbestrahlung mit ihrem sog. invertierten Tiefendosisprofil zudem den Vorteil das gesunde Normalgewebe ausreichend zu schonen und den Tumor optimal mit hohen Dosen zu bestrahlen. Die zu applizierende Dosis im Fall von Ionen wird anhand der Dichte der Materie (ρ), des LET und der Fluenz (F), der Anzahl an Teilchen pro cm^2 , berechnet (Formel 4):

$$D [\text{Gy}] = 1,602 \times 10^{-9} \left[\frac{\mu\text{m} \times \text{g} \times \text{J}}{\text{keV} \times \text{cm} \times \text{kg}} \right] \times F \left[\frac{1}{\text{cm}^2} \right] \times \text{LET} \left[\frac{\text{keV}}{\mu\text{m}} \right] \times \frac{1}{\rho} \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{g}} \right]$$

Formel 4: Formel zur Berechnung der Dosis von Ionen in Gy in Abhängigkeit der Fluenz und des LET.

Da biologisches Gewebe hauptsächlich aus Wasser besteht, wird für die Dichte des zu bestrahlenden Gewebes 1 g/cm^3 angenommen.

Neben der Unterscheidung dünn- und dicht-ionisierender Strahlung kann des Weiteren eine Einteilung in direkt- und indirekt-ionisierende Strahlung vorgenommen werden. Während direkt-ionisierende Strahlungen unmittelbar Ionisationen in der bestrahlten Materie erzeugen, wird bei indirekt-ionisierender Strahlung die Energie zunächst auf ein anderes elektrisch geladenes Teilchen übertragen, das seinerseits dann Ionisationen hervorrufen kann. Infolge direkt-ionisierender Strahlungen wird ausreichend kinetische Energie erzeugt, um beispielsweise kovalente Bindungen biologischer Moleküle wie der DNA aufzubrechen (Abbildung 5).

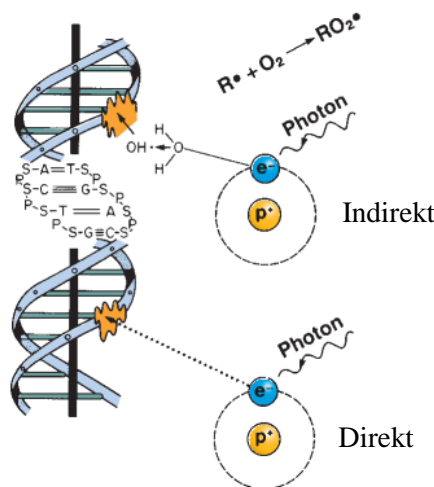


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines direkten und indirekten DNA-Schadens. Beim direkten DNA-Schaden werden kovalente Bindungen in der DNA direkt durch das entstandene Elektron zerstört, wohingegen das Elektron beim indirekten Schaden zunächst mit beispielsweise einem Wassermolekül aus der Umgebung reagiert. Dadurch werden freie Radikale erzeugt, die dann wiederum die DNA schädigen können (modifiziert nach Hall and Giaccia 2006).

Photonenstrahlen wie Röntgen wirken zudem häufig indirekt, indem durch Absorption der Photonenenergie Elektronen entstehen, die wiederum in der Lage sind chemische Bindungen zu zerstören. Die Sekundärelektronen wirken in der Zelle häufig auf die in großer Menge vorhandenen Wassermoleküle, wodurch diese ionisiert werden ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}^+ + \text{e}^-$). Bei dieser sog. Radiolyse zerfällt das positiv geladene Wassermolekül anschließend in ein Hydroxylradikal ($\text{OH}\cdot$) und ein Proton (H^+). Das im ersten Schritt freigesetzte Elektron kann mit einem weiteren Wassermolekül zum hydratisierten Elektron reagieren, wodurch ein weiteres hoch reaktives Hydroxylradikal entsteht ($\text{OH}\cdot$). Diese freien Radikale schädigen die DNA binnen kürzester Zeit (Goodhead 1994) (Abbildung 5).

Infolge der Bestrahlung mit ionisierender Strahlung tritt ein breites Spektrum an DNA-Schäden auf, die ein unterschiedlich großes Risiko für die Zelle darstellen. Neben Strangbrüchen kann es zu Basen- oder Zuckerschäden, DNA-Proteinvernetzungen oder Fehlverknüpfungen kommen (Abbildung 6). Der DNA-Doppelstrangbruch (DSB) stellt hierbei das größte Risiko für eine Zelle dar und ist am schwierigsten zu reparieren. Nach Basenverlusten und Basenmodifikationen sind DNA-Einzelstrangbrüche (ESBs) und DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) die häufigsten DNA-Schäden (Asaithamby und Chen 2011). Durch 1 Gy Röntgenstrahlung werden in etwa 40 DSBs, 100 ESBs und noch zehnmal so viele Basenschäden verursacht (Ward 1988, Hall und Giaccia 2006).

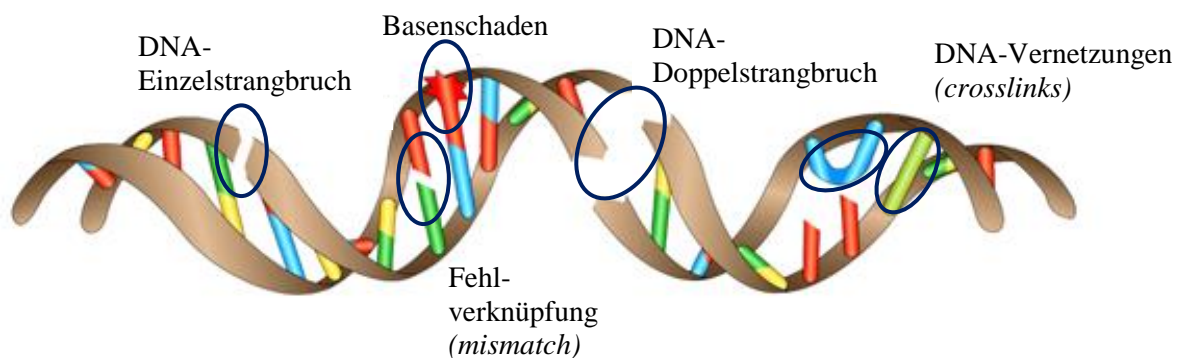


Abbildung 6: Schematische Darstellung verschiedener Arten von DNA-Schäden. <https://612bf2fb-a-62cb3a1a-s-sites.googlegroups.com/site/bi6101dnarepair/damage-detection-response/types-of-dna-damage> (08.11.19 13:24 Uhr)

Im Gegensatz zu dünn-ionisierender Röntgenstrahlung treten infolge von dicht-ionisierender, hoch-LET Ionenbestrahlung entlang der Spur des Ions vermehrt Schäden in enger räumlicher Nähe zueinander auf (Brenner und Ward 1992, Sutherland, Bennett *et al.* 2000). Nach Sutherland, Bennett *et al.* (2001) ist die Häufung der Schäden in räumlicher Nähe entscheidend. Treten zwei oder mehr Läsionen innerhalb einer oder zwei helikalen Windungen der DNA auf spricht man von gehäuften DNA-Schäden (*clustered DNA damage*) (Sutherland, Bennett *et al.* 2001), die auch als sog. komplexe Schäden bezeichnet werden (Goodhead 1994, Ward 1994). Eine hohe DNA-Schadensdichte einschließlich DSBs sind auf mehrere Ionisationsereignisse innerhalb kurzer Distanz zurückzuführen, weshalb die Komplexität und der Anteil an gehäuften (*clustered*) DNA-Läsionen in Abhängigkeit der Ionisationsdichte der Strahlung zunimmt (Goodhead 2006). Generell wird hauptsächlich zwischen DSBs und anderen Häufungen an DNA-Schäden wie oxidativen Schäden, Einzelstrangbrüchen (*single-strand breaks = SSBs*) oder abasischen Stellen (*abasic/apurinic/aprimidinic sites = APs*) unterschieden (Blaisdell, Harrison *et al.* 2001, Gollapalle, Wang *et al.* 2007). Bleiben jedoch diese nicht-DSBs in geringem Abstand

unrepariert, können auch hieraus weitere DSBs entstehen, weshalb für Zellen solche Häufungen an DNA-Schäden sehr viel schwieriger zu reparieren sind als einzelne Läsionen (Gulston, de Lara *et al.* 2004, Eccles, Lomax *et al.* 2010, Asaithamby und Chen 2011).

Die erhöhte Wirksamkeit der Ionenbestrahlung kann anhand Zell-Überlebenskurven verdeutlicht werden. Zellen, die mit der mit dünn-ionisierender Röntgenstrahlung bestrahlt wurden, überleben besser als mit derselben Dosis an Ionen bestrahlte Zellen. Die relative biologische Wirksamkeit (*relative biological effectiveness* = *RBE*) von Ionenstrahlung ist also höher im Vergleich zu Röntgenstrahlung. Das Verhältnis der Dosis einer Referenzstrahlung (D_r), meist Röntgenstrahlung, und der Dosis der Ionenstrahlung (D_i), die denselben Überlebens effekt zur Folge hat (Isoeffekt), wird als RBE definiert (Formel 5).

$$RBE = \frac{D_r}{D_i} \Big|_{\text{Isoeffekt}}$$

Formel 5: Definition der relativen biologischen Wirksamkeit (RBE).

In Abbildung 7 ist beispielhaft das Zellüberleben von Hamsterzellen (CHO-Zellen) nach Röntgen- im Vergleich zu Ionenbestrahlung verschiedener Energien aufgezeigt. Generell ist das Überleben aufgrund des zuvor erwähnten erhöhten RBEs infolge der Ionenbestrahlung stärker reduziert als nach Röntgenbestrahlung. Des Weiteren wird ersichtlich, dass mit zunehmender Energie der Ionen die biologische Wirksamkeit dieser abnimmt. Dies liegt an der zuvor beschriebenen höheren Energie und Geschwindigkeit der Ionen, infolge derer weniger Ionisationsergebnisse auftreten, die die DNA schädigen und das Zellüberleben negativ beeinflussen könnten. Zudem beeinflusst die Ordnungszahl des Ions das Zellüberleben. Mit steigender Ordnungszahl des Ions ist das Überleben der bestrahlten Zellen bei gleicher Energie besser.

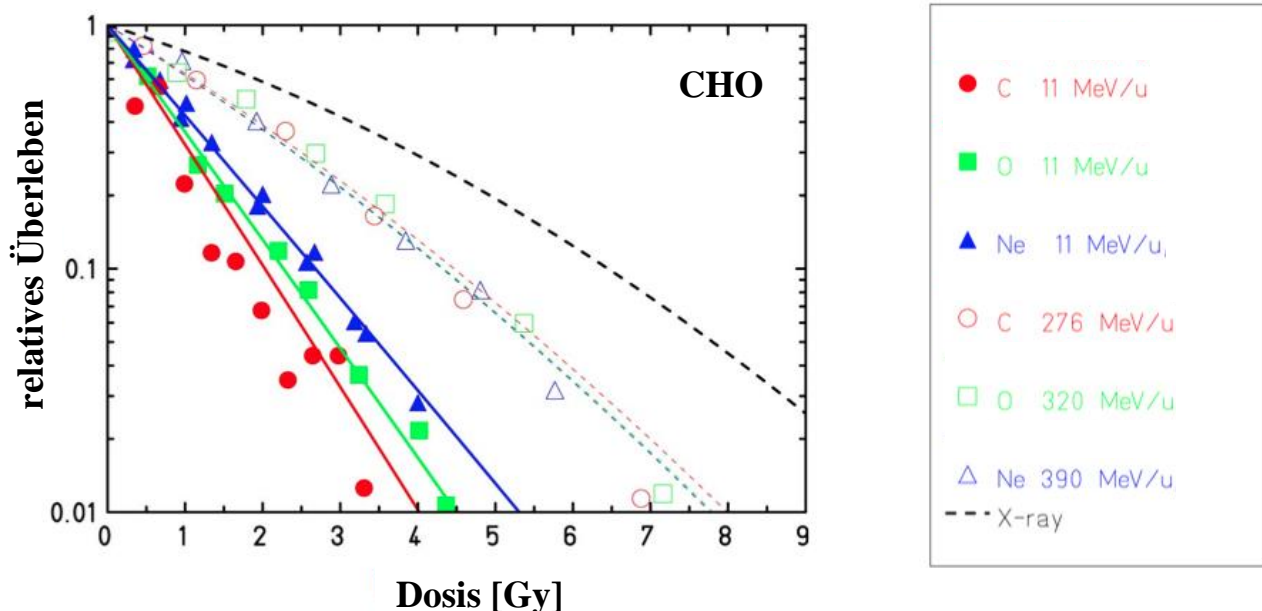


Abbildung 7: Klonogenes Zellüberleben von Hamsterzellen, die mit Röntgen im Vergleich zu verschiedenen Ionen unterschiedlicher Energien bestrahlt wurden. CHO-Zellen wurden mit 250 kV Röntgenstrahlung (X-ray) bzw. Kohlenstoff- (C), Sauerstoff- (O) oder Neonionen (Ne) unterschiedlicher Energien zwischen 11 MeV/u und 390 MeV/u bestrahlt und anschließend das klonogene Zellüberleben ermittelt. Nach Röntgenbestrahlung überlebten die Zellen am besten. Mit steigender Dosis einerseits und niedrigerer Energie der Ionen sowie geringerer Ordnungszahl des Elements andererseits war eine Reduktion des Zellüberlebens deutlich erkennbar (modifiziert nach Weyrather-Kraft et al. 1999)

Nach Röntgenbestrahlung und hoch-energetischer Ionenbestrahlung nimmt die Überlebenskurve einen linear-quadratischen Verlauf an. Das Überleben einer bestimmten Dosis kann daher über einen linearen Term (α) sowie einen quadratischen Term (β) definiert werden (Formel 6).

$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

Formel 6: Linear-quadratisches Modell des Zellüberlebens [S].

Der lineare α -Term beschreibt hierbei die initiale Steigung der Kurve und ist für den exponentiellen Abfall, wie er nach hoch-energetischer Ionenstrahlung zu beobachten ist, charakteristisch. Der quadratische β -Term hingegen ergibt sich aus der Krümmung der Kurve und ist von der Reparaturfähigkeit der Zellen abhängig. Je niedriger die Energie der Ionbestrahlung, desto mehr nähert sich der β -Term dem Wert null an und die Kurve verläuft linearer. Das Verhältnis aus beiden Termen, α/β , stellt den Punkt da, an dem beide Komponenten denselben Einfluss auf das Zellüberleben haben und wird in der Strahlentherapie oft als Anhaltspunkt für die Strahlenempfindlichkeit eines Gewebes genutzt.

1.2. Zellzyklus

Die Reaktion einer Zelle auf verschiedene Formen von DNA-Schäden und auch die Wahl des Reparaturwegs, um die entstandenen DNA-Schäden zu beheben, sind unter anderem von der Zellzyklusphase abhängig. Der eukaryontische Zellzyklus verläuft in vier Phasen (Abbildung 8). Grundlage des Wachstums ist in den meisten Geweben die Zellteilung, bei der aus einer Zelle zwei Tochterzellen entstehen. Die Phase, in der die eigentliche Zell- und Kernteilung durch Trennung der Chromosomen stattfindet, ist die M (Mitose)-Phase. Bevor es jedoch zur Teilung kommen kann, muss der DNA-Gehalt der Zelle verdoppelt werden. Diese DNA-Synthese bzw. Replikation ist Gegenstand der S(Synthese)-Phase, an die sich die G₂(Gap)-Phase anschließt, in der zusätzliche, essentielle Proteine synthetisiert werden. Vor dem Übergang in die Mitose-Phase, am Ende der G₂-Phase wird die DNA auf Fehler überprüft (G₂/M-*Checkpoint*), sodass der Übergang gesetztenfalls unterbunden und die Zelle in einen Arrest (G₂-Arrest) übergehen kann, um eventuelle Fehler vor der Teilung zu reparieren. Nach der Zellteilung und Entstehung zweier Tochterzellen mit komplett identischer genetischer Information gehen diese in die G₁(Gap)-Wachstumsphase über, bevor sie erneut in die S-Phase eintreten und sich erneut teilen oder in eine sog. G₀-Ruhephase übergehen können. Die meisten Zellen des menschlichen Körpers befinden sich in dieser G₀-Phase. Einige Zellen, wie Fibroblasten, Epithelzellen oder Lymphozyten, haben die Möglichkeit aus diesem nicht-proliferierenden Status wieder in den Zellzyklus einzutreten (Yao 2014). Anderen ist dies aufgrund von Seneszenz oder Ausdifferenzierung nicht möglich. Neben der S-Phase, deren Dauer von der Länge der zu replizierenden DNA abhängt, ist die G₁-Phase typischerweise die längste Phase. Daher befinden sich in der Regel der größte Prozentsatz der Zellen in dieser Phase, weshalb Analysen in dieser Zellzyklusphase enorm wichtig sind.

Zur Kontrolle des Zyklusses verfügt die Zelle neben dem G₂-*Checkpoint* über weitere Kontrollpunkte am Ende der G₁- und auch innerhalb der S- und M-Phase. All diese Kontrollpunkte (*Checkpoints*) sollen verhindern, dass die Zelle mit unreparierten Schäden im Zellzyklus voranschreitet und Fehler an Tochterzellen weitergibt, was

das Risiko für Entartungen erhöhen würde. Die Kontrollpunkte reagieren mit sehr unterschiedlicher Sensitivität. Während der *G1-Checkpoint* erst nach etwa 4-6 Stunden nach Bestrahlung vollständig aktiviert wird, reagiert der *G2-Checkpoint* ab einer Anzahl von ca. 10-20 DSBs (Deckbar, Jeggo *et al.* 2011). Verschiedene regulatorische Proteine wie Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) sind an der Regulation und Kontrolle des Zellzyklus beteiligt und werden zellzyklusspezifisch exprimiert (El-Aouar Filho, Nicolas *et al.* 2017, Matson und Cook 2017).

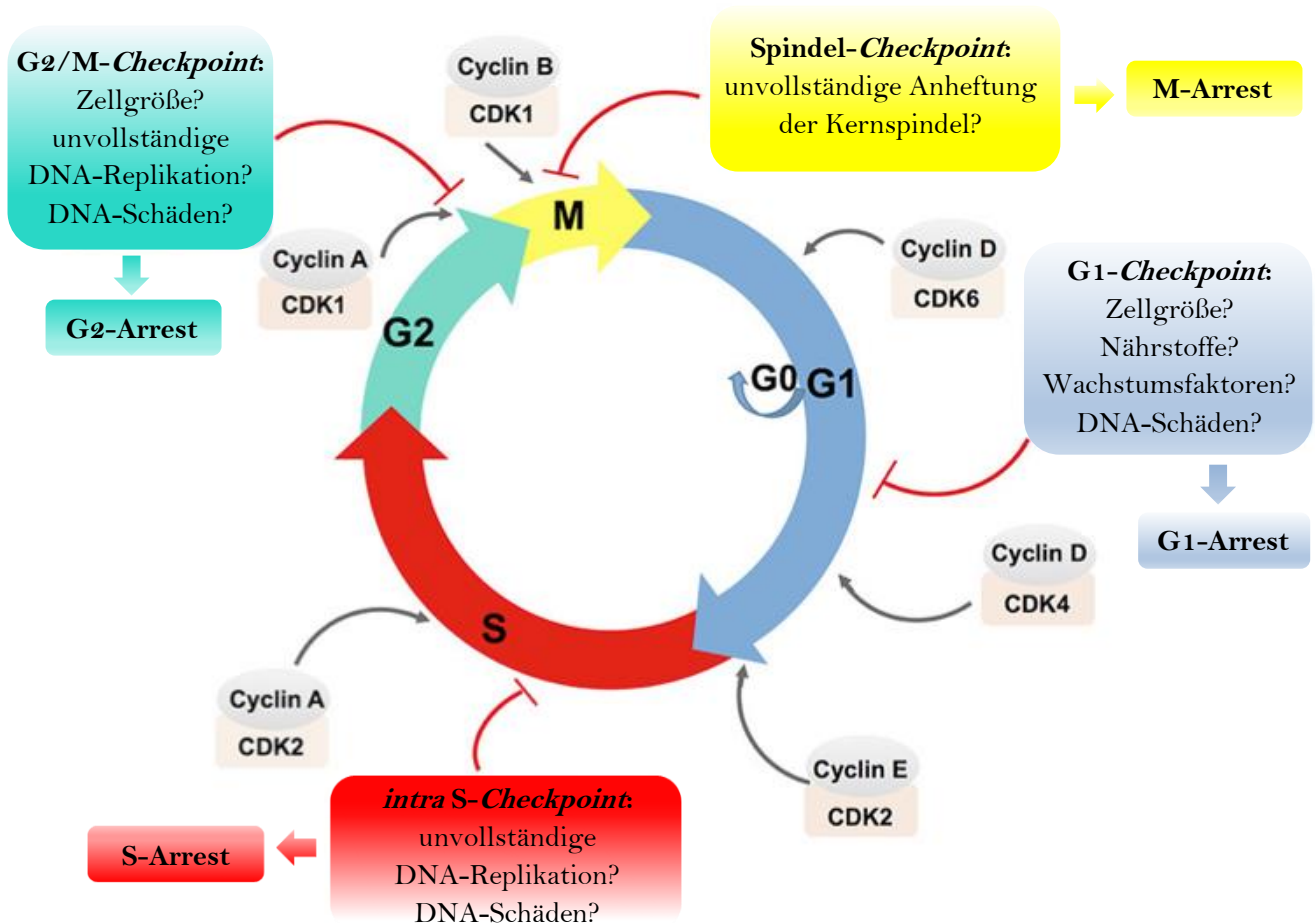


Abbildung 8: Schema des eukaryontischen Zellzyklus und dessen Kontrollpunkte. Am Ende der G1-, G2- und innerhalb der S- sowie M-Phase verfügt die Zelle über Kontrollpunkte, sog. *Checkpoints*, an denen die DNA auf Schäden überprüft oder fehlerhaft ablaufende Prozesse erkannt werden können. Kontrolliert wird der Zellzyklus durch Komplexe aus Cyclinen und Cyclin-anhängigen Kinasen (CDKs). Werden fehlerhafte oder unvollständige Prozesse erkannt, kann ein Voranschreiten im Zellzyklus verhindert und in einen Arrest übergegangen werden (modifiziert nach El-Aouar Filho, Nicolas *et al.* 2017).

Dies wird sich bei der zellzyklusabhängigen Analyse zu Nutze gemacht, indem beispielsweise durch antikörperbasiertes Anfärben von Proteinen der S/G2-Phase wie CENP-F (*centromer protein F*) oder Geminin S/G2-Phase- von G1-Phase-Zellen unterschieden werden können. Auch bei den in der vorliegenden Arbeit häufig eingesetzten Hela.S-Fucci-Zellen wurde sich der zellzykluspezifischen Expression von Fluoreszenzgekoppelten Proteinen zur Differenzierung der einzelnen Zellzyklusphasen bedient. Cdt1 diente hierbei als G1- und frühen S-Phase Marker. Cdt1 wird während der S- und G2-Phase vom Proteasom abgebaut und ist in G1 aktiv, wohingegen Geminin während der M- und G1-Phase proteosomally abgebaut und in der S-/G2-/M-Phase

exprimiert wird (Mechali und Lutzmann 2008, Newman und Zhang 2008, Sakaue-Sawano, Kurokawa *et al.* 2008). Genauere Informationen sind Kapitel 2.1.16 zu entnehmen.

1.3. Regulation der DNA-Schadensantwort über posttranslationale Modifikation durch Ubiquitinierung

Der schwerwiegendste DNA-Schaden ist der DNA-Doppelstrangbruch (DSB), da die Gefahr für genomische Instabilität am größten ist (Ward 1975, Olive 1998). Täglich entstehen spontan durchschnittlich etwa 10 DSBs pro Zelle (Lieber 2010). Die DNA-Schadensantwort (*DNA damage response = DDR*) ist ein vielstufiger Prozess unter Beteiligung von unterschiedlichsten Proteinen (Abbildung 9). Nach der Erkennung eines Schadens durch Sensorproteine wird das Signal verstärkt und an Effektorproteine weitergeleitet, die die schlussendliche Reaktion der Zelle einleiten (Khanna und Jackson 2001, Bakkenist und Kastan 2003).

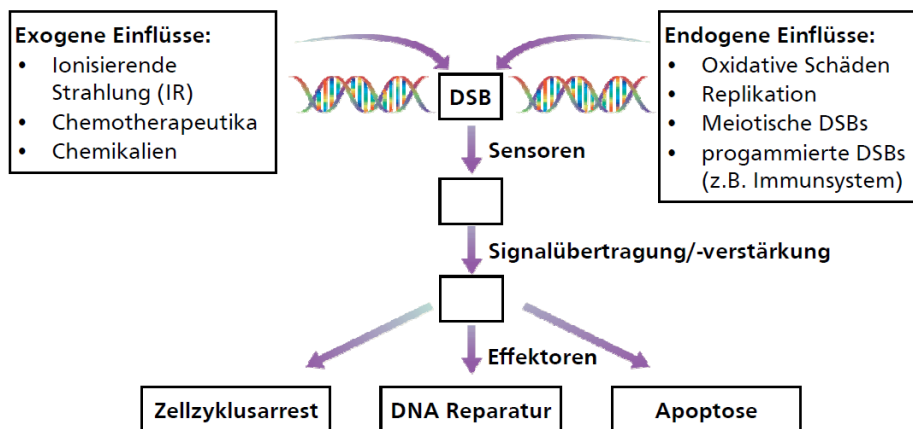


Abbildung 9: Übersicht der DNA-Schadensantwort (*DNA damage response = DDR*). Sensorproteine erkennen exogen oder endogen induzierte DSBs und geben das Signal an Proteine weiter, die dieses verstärken. Effektorproteine sind schlussendlich dafür verantwortlich verschiedenste Reaktionen wie den Zellzyklusarrest, die Reparatur der DNA oder den programmierten Zelltod (Apoptose) der Zelle einzuleiten (modifiziert nach Khanna *et al.* 2001).

Viele dieser Signalkaskaden werden durch posttranslationale Modifikationen (PTM) von Proteinen wie Phosphorylierungen oder Ubiquitinierungen gesteuert.

Ubiquitin und der Multienzymkomplex, das Proteasom, wurden in den 1970er Jahren entdeckt (Ciechanover, Finley *et al.* 1984, Hershko und Ciechanover 1998). 2004 wurde für die Entdeckung des Ubiquitin-Proteasom-Systems (*UPS = ubiquitin proteasome system*) der Nobelpreis in Chemie verliehen (Herrmann, Lerman *et al.* 2007). Die Ubiquitinierung ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem zunächst Ubiquitin in einer ATP-abhängigen Reaktion aktiviert wird. Dies führt zu einer Thiolesterbindung zwischen Ubiquitin und dem Ubiquitin-Aktivierungsenzym (E1). Im Anschluss wird Ubiquitin ebenfalls über eine Thiolesterbindung auf das konjugierende Enzym (E2) übertragen. Schlussendlich interagiert die Ubiquitin-Ligase (E3) einerseits mit dem Substrat und andererseits mit dem E2-Enzym, auf das das Ubiquitin zuvor übertragen wurde, und führt die direkte Übertagung des Ubiquitins vom E2-Enzym auf das Substrat aus. Dieser Vorgang kann mehrfach

wiederholt werden, sodass Ketten aus vielen Ubiquitinen entstehen (Polyubiquitinierung) (Lipkowitz und Weissman 2011) (Abbildung 10).

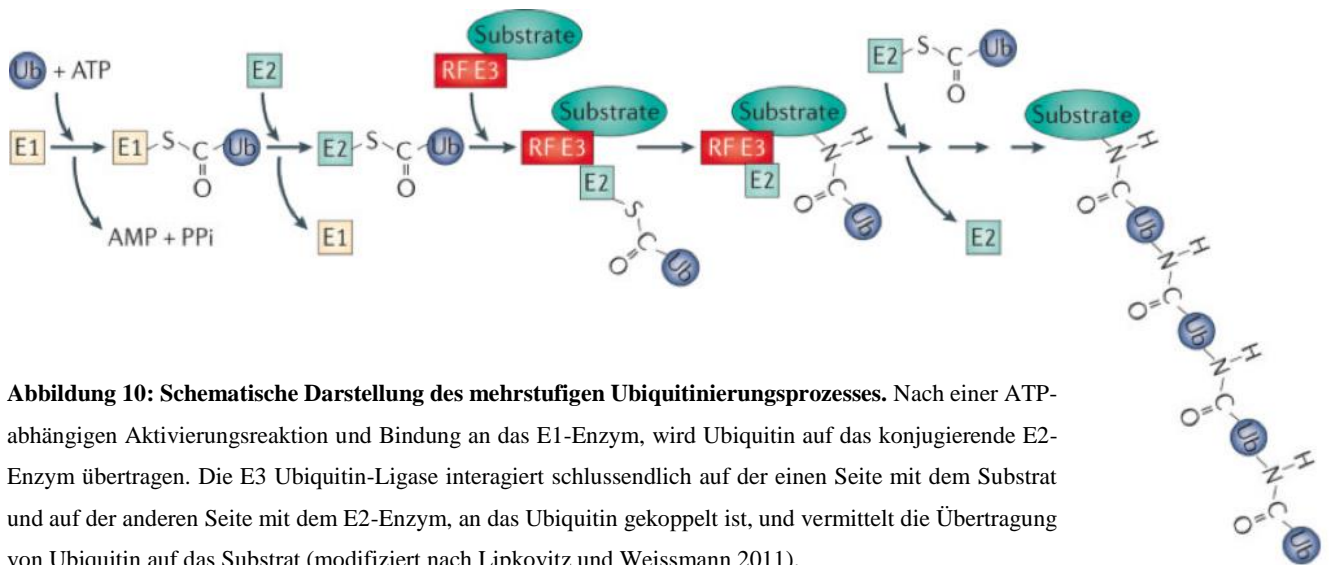


Abbildung 10: Schematische Darstellung des mehrstufigen Ubiquitinierungsprozesses. Nach einer ATP-abhängigen Aktivierungsreaktion und Bindung an das E1-Enzym, wird Ubiquitin auf das konjugierende E2-Enzym übertragen. Die E3 Ubiquitin-Ligase interagiert schlussendlich auf der einen Seite mit dem Substrat und auf der anderen Seite mit dem E2-Enzym, an das Ubiquitin gekoppelt ist, und vermittelt die Übertragung von Ubiquitin auf das Substrat (modifiziert nach Lipkowitz und Weissmann 2011).

In Abhängigkeit der Art und Weise der Kopplung der Ubiquitinproteine aneinander können unterschiedlichste Folgeaktionen ausgelöst werden. Die Isopeptidbindung entsteht immer zwischen dem C-Terminus des Ubiquitins und der ϵ -Aminogruppe des Lysinrests des Substrats. Ubiquitin ist ein kleines Protein bestehend aus 76 Aminosäuren, weist ein Molekulargewicht von 8,6 kDa auf und besitzt an sich sieben Lysinreste (K6, K11, K29, K33, K48 und K63), über die eine Polyubiquitinkette aufgebaut werden kann (Komander und Rape 2012) (Abbildung 11).

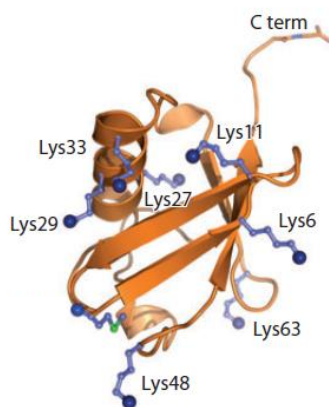


Abbildung 11: Schema des Ubiquitin-Proteins.

Ubiquitinprotein besteht aus 76 Aminosäuren und weist sieben Lysine auf, an denen weitere Ubiquitinproteine gebunden werden können. Über den C-Terminus entsteht die Bindung zum Substrat (modifiziert nach Komander and Rape 2012).

So führt eine Kopplung über Lysin 48 (K48) zumeist zum proteosomalen Abbau des Proteins, wohingegen nach Bindung an Lysin 63 (K63) andere, typischerweise nicht mit dem Proteasom in Verbindung stehende Reaktionen in Gang gesetzt werden.

Das Proteasom besteht aus der zentralen 20S- sowie zwei 19S-Untereinheiten, die in Eukaryonten zusammen das 26S-Proteasom bilden (Abbildung 12). Die 19S-Untereinheiten besitzt ATP-Hydrolyseeigenschaften, wohingegen die 20S-Untereinheit, die ihrerseits aus vier Proteinringen mit je sieben Untereinheiten besteht und die Form eines Zylinders hat, die katalytische Aktivität zur Zerstörung von Peptidbindungen aufweist. Die

beiden 19S-Untereinheiten des Proteasoms können für den proteosomalen Abbau ubiquitinierte Proteine erkennen und entfalten, worauf hin sie an die zentrale, proteolytisch aktive 20S-Untereinheit weitergereicht und in kurze Peptide zerlegt werden.

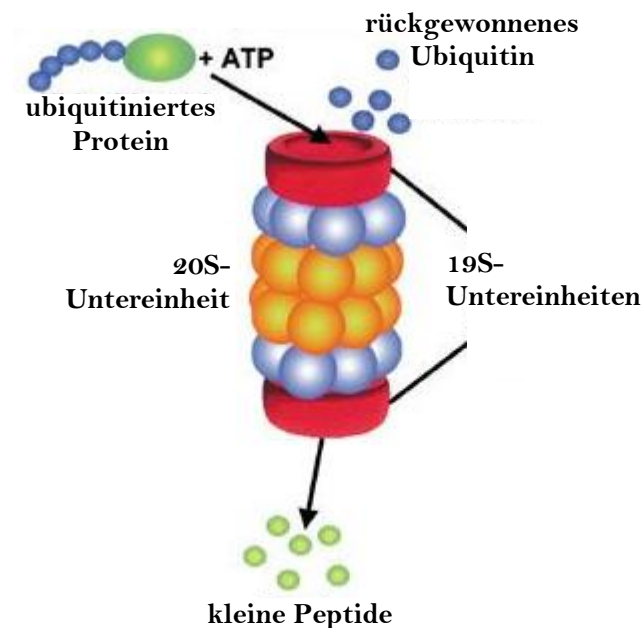


Abbildung 12: Darstellung des Proteasoms. Das eukaryontische 26S-Proteasom besteht aus zwei 19S- und einer zentralen 20S-Untereinheit (modifiziert nach Almond and Cohen 2002).

Neben der Regulation von Proteinexpressionen kontrolliert das UPS viele weitere Prozesse, unter anderem auch die Reparatur der DNA (Xie 2010). Die beiden prominentesten DNA-Reparaturproteine, die mit Ubiquitinierung in Verbindung gebracht werden, sind PCNA (*Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*) und p53 (*Protein 53*). P53 kann sowohl mono- als auch polyubiquitiniert werden und ist unter anderem für die Regulation des Zellzyklusarrests und des Zelltods wichtig. PCNA kann durch Rad6/Rad18 ubiquitiniert werden (Hoege, Pfander *et al.* 2002). Während Monoubiquitinierung von PCNA zur Translänionssynthese (TLS) und zu Mutationen im Genom führen kann (Zan, Komori *et al.* 2001, Brnzei, Seki *et al.* 2004), werden durch Polyubiquitinierung meist fehlerfreie Prozesse aktiviert (Ulrich und Jentsch 2000, Hoege, Pfander *et al.* 2002, Unk, Hajdu *et al.* 2008). Aber auch die DDR und die beiden Hauptdoppelstrangbruch-Reparaturmechanismen NHEJ (Nicht-Homologe End-Verknüpfung) und HR (Homologe Rekombination) werden durch posttranslationale Modifikationen durch Ubiquitinierung und Interaktionen mit dem Proteasom beeinflusst (Krogan, Lam *et al.* 2004, Stewart, Panier *et al.* 2009, Lukas, Savic *et al.* 2011). So zeigen neuerere Veröffentlichungen, dass neben Mdc1 auch die Ubiquitin-Ligase RNF8 rekrutiert wird, die ihrerseits H2A ubiquitiniert und so die Bindung einer weiteren Ubiquitin-Ligase, RNF168, fördert (Doil, Mailand *et al.* 2009, van Attikum und Gasser 2009, Al-Hakim, Escibano-Diaz *et al.* 2010). Dies bietet wiederum die Möglichkeit andere Proteine wie BRCA1 (*BReast CAncer 1*) oder 53BP1 (*p53 binding protein 1*) an den Schaden zu binden. 53BP1 wird sowohl über die Phosphorylierung durch ATM (Harding, Coackley *et al.* 2011) als auch die Ubiquitinierung durch RNF8 und RNF168 (Bohgaki, Bohgaki *et al.* 2013, Hu, Wang *et al.* 2014) kontrolliert. In S/G2 wird 53BP1 dephosphoryliert und die Rekrutierung von BRCA1 gefördert, wohingegen in G1 53P1 in

seiner phosphorylierten Form mit RIF1 (*Rap interacting factor*) und PtIP (*Pax2 transactivation domain interacting protein*) interagiert, weshalb diese Prozesse entscheidend auf die Wahl des Reparaturwegs Einfluss nehmen (Shibata 2017). Diverse Studien beschreiben im Hinblick auf die DNA-End-Prozessierung durch Resektion das antagonistische Zusammenspiel der Faktoren BRCA1 und 53BP1 (Bouwman, Aly *et al.* 2010, Bunting, Callen *et al.* 2010, Chapman, Sossick *et al.* 2012, Zimmermann, Lottersberger *et al.* 2013, Bakr, Kocher *et al.* 2016). Während BRCA1 zusammen mit CtIP DNA-End-Resektion fördert, nimmt 53BP1 im Komplex mit RIF1 eine resektionsantagonistische Wirkung ein (Chapman, Barral *et al.* 2013, Escibano-Diaz, Orthwein *et al.* 2013, Zimmermann, Lottersberger *et al.* 2013). Nach Schmidt, Galanty *et al.* (2015) ist die posttranslationale Modifikation durch Ubiquitinierung von CtIP durch RNF138 für dessen Rekrutierung in S/G2 von entscheidender Bedeutung und beeinflusst auf diesem Wege die Resektion. Die Ubiquitin-Ligase RNF138 nimmt nach Ismail, Gagne *et al.* (2015) ebenfalls Einfluss auf die Resektion, indem sie in S/G2 den Resektionsantagonisten Ku80 ubiquitiniert und so dessen Ablösung vom Schaden fördert und exzessivere Resektion erlaubt. Dies demonstriert die Bedeutung der posttranslationalen Proteinmodifikation durch Ubiquitinierung für die Regulation der DNA-Schadensantwort sowie DNA-End-Prozessierung durch Resektion, welche entscheidend Einfluss die Wahl des Reparaturwegs nimmt.

1.4. DNA-Schadenserkennung

Wie zuvor erwähnt ist die Zelle bei extremen Schäden in der Lage ihren Fortschritt im Zellzyklus anzuhalten, um mehr Zeit für die Reparatur der DNA-Schäden zu gewinnen. Um DSBs zu reparieren hat die Zelle mehrere Mechanismen entwickelt, deren Wahl von der Zellzyklusphase, der Chromatinstruktur, aber auch der Komplexität des Schadens beeinflusst wird. Zudem unterscheiden sie sich in ihrer Genauigkeit und Geschwindigkeit die DSBs zu reparieren. Die beiden Haupt-DSB-Reparaturmechanismen sind die klassische Variante der Nicht-Homologen End-Verknüpfung (*classical non homologous end joining* = *c-NHEJ*) und die Homologe Rekombination (HR). Ist der Schaden für die Zelle jedoch zu groß, verfügt sie zudem über Mechanismen, die es ihr erlauben programmiert ihren Zelltod (Apoptose) einzuleiten. So kann verhindert werden, dass sie mit enormen Schäden im Zellzyklus voranschreitet, was die Wahrscheinlichkeit für chromosomale Aberrationen drastisch erhöhen würde (Jeggo und Löbrich 2006).

Die DSB-Erkennung läuft über die beiden Komplexe MRN bestehend aus Mre11 (*meiotic recombination 11*), Rad50 (*radiation 50*), Nbs1 (*Nijmegen breakage syndrome1*) und Ku (Ku70/Ku80-Heterodimer), die sich an die Schadensstelle anlagern und die DSB-Enden zusammenhalten (D'Amours und Jackson 2002, Jackson 2002). Die beiden zentralen Proteine der sich anschließenden DNA-Schadensantwort (*DNA damage response* = *DDR*) sind die Proteinkinasen ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ATM and Rad3 related*) (Kim, Lim *et al.* 1999, Abraham 2001). Mutationen in diesen Genen führen im Fall von ATM zur gleichnamigen Krankheit, die mit Immundefekten und einer erhöhten Prädisposition für Krebs einhergeht. Mutationen im ATR-Gen können zum Seckel-Syndrom mit eingeschränktem Wachstum und geistiger Retardierung führen. Völlig inaktives ATR ist bei Mäusen bereits embryonal lethal, was die außerordentliche Wichtigkeit dieses Faktors für die Überlebensfähigkeit von Zellen unter verdeutlicht (Brown und Baltimore 2000, Shechter, Costanzo *et al.* 2004). Während ATM in allen Zellzyklusphasen an der DDR beteiligt ist, kommt ATR vorwiegend in der S-Phase bei

replikativem Stress zum Einsatz. Nach der DSB-Induktion und Anlagerung des MRN-Komplexes und des Ku-Heterodimers, kann über den MRN-Komplex Faktor Nbs1 an Serin 1981 autophosphoryliertes, aktiviertes ATM rekrutiert werden (Lee und Paull 2005). Durch ATM wird die Histonvariante H2AX an Serin 139 phosphoryliert (γ H2AX) (Rogakou, Pilch *et al.* 1998), was die Basis für die Rekrutierung weiterer Reparaturfaktoren, wie Mdc1 (*mediator of damage control 1*), darstellt, das über γ H2AX gebunden werden kann (Stucki, Clapperton *et al.* 2005, Kim, Minter-Dykhouse *et al.* 2006, Lou, Minter-Dykhouse *et al.* 2006, Meek, Douglas *et al.* 2007). Nun werden weitere MRN-Komplexe und ATM rekrutiert, sodass sich das γ H2AX-Signal über eine positive Rückkopplungsschleife bis zu einem Bereich von zwei Megabasenpaaren ausbreiten kann (Rogakou, Pilch *et al.* 1998, Aymard, Bugler *et al.* 2014, Isono, Niimi *et al.* 2017). Über Antikörperbasierte Immunfluoreszenzfärbungen können DSBs über das γ H2AX-Signal mittels Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht und die Reparatur der DSBs verfolgt werden (Löbrich, Shibata *et al.* 2010).

1.5. DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturwege

Einer der beiden Haupt-DSB-Reparaturmechanismen, der während des kompletten Zellzyklus aktiv ist, ist die klassische Form der Nicht-homologen Endverknüpfung (c-NHEJ) (Abbildung 13A).

Neben dem MRN-Komplex bindet der DNA-PK-Komplex an die freien DNA-Enden, wodurch sie vor Degradierung und Prozessierung geschützt werden. Der DNA-PK-Komplex besteht aus der katalytischen Untereinheit der DNA-PK (DNA-PKcs) sowie dem Heterodimer Ku70/Ku80, das einen Ring um die Bruchenden formt (Walker, Corpina *et al.* 2001), während die DNA-PKcs die Enden zusammenhält. Nun kommt es zur Autophosphorylierung der DNA-PKcs an Serin 2056 (Meek, Douglas *et al.* 2007) und einer weiteren Phosphorylierung durch ATM (Chen, Zhao *et al.* 2007), die eine Konformationsänderung zur Folge hat, wodurch die DNA-Enden frei werden. So können sich nun weitere NHEJ-Faktoren anlagern (Weterings und Chen 2007) und die Enden schlussendlich durch die DNA-Ligase IV im Komplex mit XRCC4 (*X-rays repair cross complementing protein 4*) und im Zusammenspiel mit XLF (*XRCC4-like factor*) ligiert werden. Bevor die Enden ligiert werden können, müssen die DNA-Enden modifiziert, Lücken gefüllt und störende Sekundärstrukturen aufgelöst werden. Die Nuklease Artemis interagiert mit der DNA-PKcs infolge deren Phosphorylierung durch ATM und kann über ihre Endonukleasefunktion Sekundärstrukturen auflösen (Ma, Pannicke *et al.* 2002). Durch das direkte Ligieren der DNA-Enden und das fehlende Abgleichen mit einer homologen Sequenz treten bei diesem Mechanismus häufig Fehler auf und es kommt zu Deletionen. Die fehlende Notwendigkeit einer homologen Matrize ermöglicht jedoch einen Einsatz dieses DSB-Reparaturwegs während des kompletten Zellzyklus.

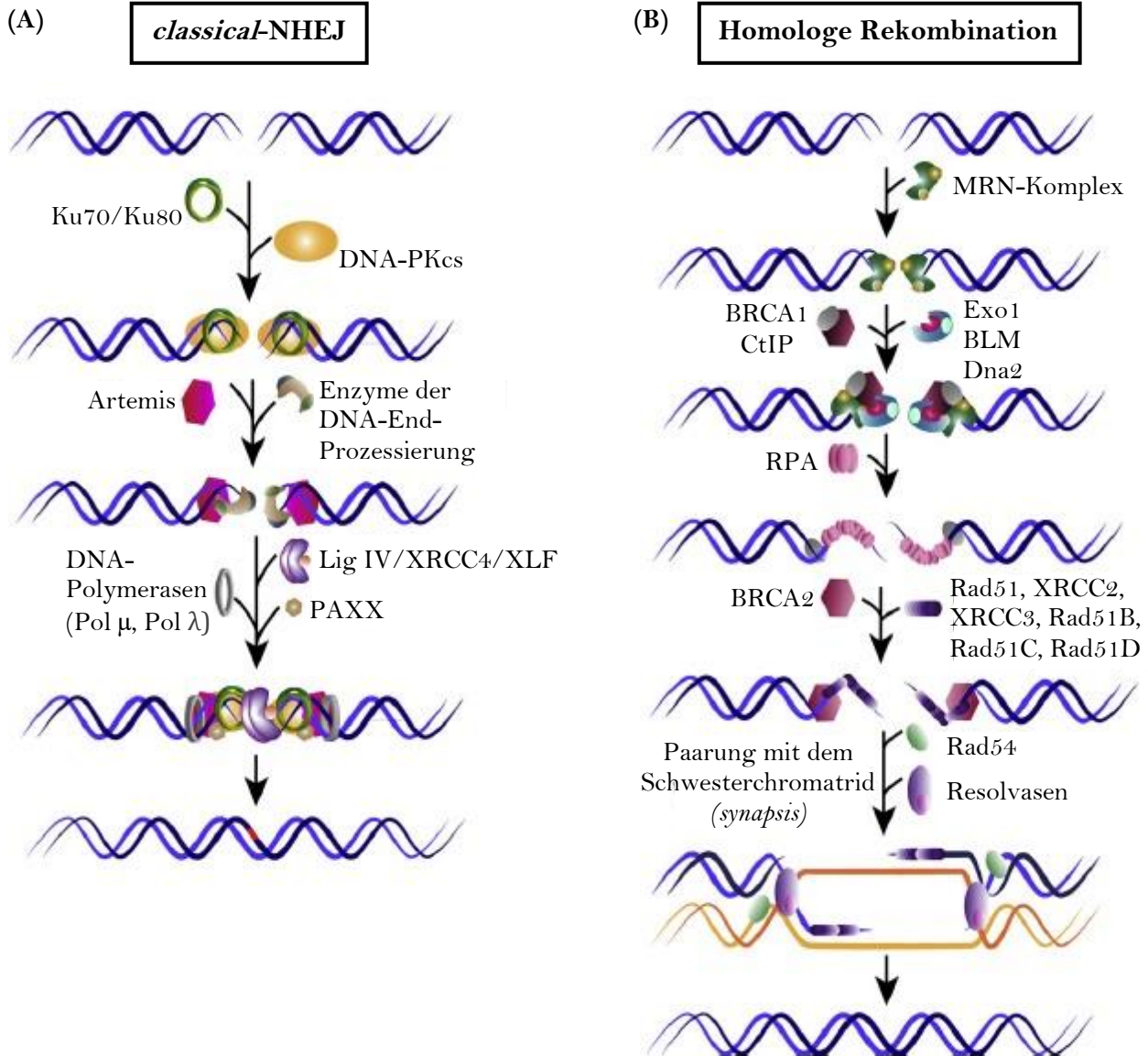


Abbildung 13: Vereinfachte Darstellung der beiden Haupt-Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismen der klassischen Nicht-homologen Endverknüpfung (c-NHEJ) und der Homologen Rekombination (HR). (A) Im Fall des c-NHEJ bindet zunächst das Ku70/Ku80-Heterodimer an die DSB-Enden, worauf die katalytische Untereinheit der DNA-PK (DNA-PKcs) rekrutiert und der DNA-PK-Komplex ausgebildet wird. In seiner phosphorylierten Form wird über DNA-PK, XRCC4, die DNA Liagse IV und XLF rekrutiert, um die Bruchenden zu ligieren. (B) Bei der Homologen Rekombination bindet zunächst der sog. MRN-Komplex bestehend aus Mre11, Rad50 und Nbs1 an die Bruchenden. Nach der Rekrutierung und dem Prozessieren der Enden durch Nukleasen wie Mre11, CtIP und Exo1 bindet das Einzelstrangbruchbindeprotein RPA an die einzelsträngigen Bereiche, um diese zu stabilisieren. Katalysiert durch BRCA2 wird RPA im Folgenden durch Rad51 ersetzt, bevor es zur Paarung und Homologiesuche auf dem Schwesterchromatid kommt. Anschließend werden *D-loop* und *Holiday-Junction* ausgebildet. Der fehlende, geschädigte DNA-Abschnitt kann daraufhin auf Basis einer homologen Matrizze, zumeist des Schwesterchromatids, synthetisiert und der Schaden so fehlerlos repariert werden (modifiziert nach Iliakis et al. 2015).

Der zweite Haupt-DSB-Reparaturmechanismus ist die Homologe Rekombination (HR). Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 13B ersichtlich. Da sich diese zumeist fehlerfrei ablaufende Reparatur einer homologen Matrize als Vorlage bedient, beschränkt sie sich auf die späte S- und G2-Phase. Nach Bindung des MRN-Komplexes, Rekrutierung von ATM und der Ausbildung von Bereichen phosphorylierten H2AX (γ H2AX) (Lee und Paull 2005) erfolgt die weitreichende Prozessierung der DNA-Enden (Nakamura, Kogame *et al.* 2010). Durch die Nukleasen Mre11, CtIP (*CtBP interacting protein*) und Exo1 (*exonuclease 1*) werden einzelsträngige 3'-Überhänge generiert (Pardo, Gomez-Gonzalez *et al.* 2009). Dieser Vorgang, bei dem die Phosphodiesterbindung zwischen zwei Nukleotiden hydrolysiert und DNA-Enden in 5'-3' Richtung durch Nukleasen degradiert wird, wird als Resektion bezeichnet (Longhese, Bonetti *et al.* 2010, Mimitou und Symington 2011). Initiiert wird die Resektion nachdem CtIP durch ATM und Cdk2 (*cyclin-dependent kinase 2*) phosphoryliert, durch BRCA1 und die E3 Ubiquitin-Ligase RNF138 (*RING finger protein 138*) ubiquitiniert und somit an den Schaden rekrutiert und aktiviert wurde (You und Bailis 2010, Schmidt, Galanty *et al.* 2015). Die entstandenen einzelsträngigen Bereiche werden durch das Protein RPA (*replication protein A*) geschützt und stabilisiert. RPA ist dafür bekannt effektiv und mit der höchsten Affinität an einzelsträngige DNA-Bereiche ab einer Länge von 15 bp zu binden, um diese zu stabilisieren. Daher können resektierte, einzelsträngige DNA-Bereiche über Immunfluoreszenzfärbung gegen RPA sichtbar gemacht und quantifiziert werden (Chen und Wold 2014). Man geht davon aus, dass durch Mre11 und CtIP ein kurzer Bereich von etwa 50-100 Nukleotiden resektiert wird und für die exzessivere Resektion weitere Faktoren wie Exo1 und die Helikase Bloom (BLM) benötigt werden (Mimitou und Symington 2008).

Ein wichtiger Schritt, um exzessivere Resektion zu erlauben, ist die Entfernung des Resektionsantagonisten Ku80 vom Schaden. Mehrere Studien gehen davon aus, dass die Resektion kurzer Bereiche in Anwesenheit des Ku-Heterodimers erfolgen kann, jedoch anschließend für exzessivere Prozessierung entfernt werden muss (Chapman, Taylor *et al.* 2012, Ferretti, Lafranchi *et al.* 2013, Ismail, Gagne *et al.* 2015, Chanut, Britton *et al.* 2016). Nach Ismail, Gagne *et al.* (2015) ist hierfür in S/G2 die Ubiquitinierung von Ku80 durch die Ubiquitin-Ligase RNF138 entscheidend, sodass ubiquitiniertes Ku80 anschließend über die AAA-ATPase p97/VCP (*valosin-containing protein*) entfernt werden kann (van den Boom, Wolf *et al.* 2016). Nach der DNA-End-Prozessierung durch Resektion wird über BRCA2 RPA durch Rad51 ersetzt (Pellegrini, Yu *et al.* 2002), und das Rad51-Nukleoproteinfilament ausgebildet. Dieses vermittelt die Homologiesuche und das Einwandern der einzelsträngigen Bereiche in die homologe Matrize; zumeist die Schwesterchromatide (Modesti und Kanaar 2001, Essers, Houtsmuller *et al.* 2002). In dieser D-Schleifen-Struktur (*displacement loop* = *D-loop*) können fehlende Nukleotide anhand der Vorlage der homologen Schwesterchromatide durch die Polymerase I neu synthetisiert werden (Li und Heyer 2008). Nun erfolgt die Ligation der Enden über das sog. *synthesis-dependent strand annealing* (SDSA) oder die Formation und anschließender Auflösung der *Holliday Junction* (Buisson, Dion-Cote *et al.* 2010). Die HR wird bevorzugt bei DSBs in der S-Phase nach Fehlern in der Replikation, blockierten Replikationsgabeln und bei komplexen DSBs, induziert durch hoch-LET-Bestrahlung, eingesetzt.

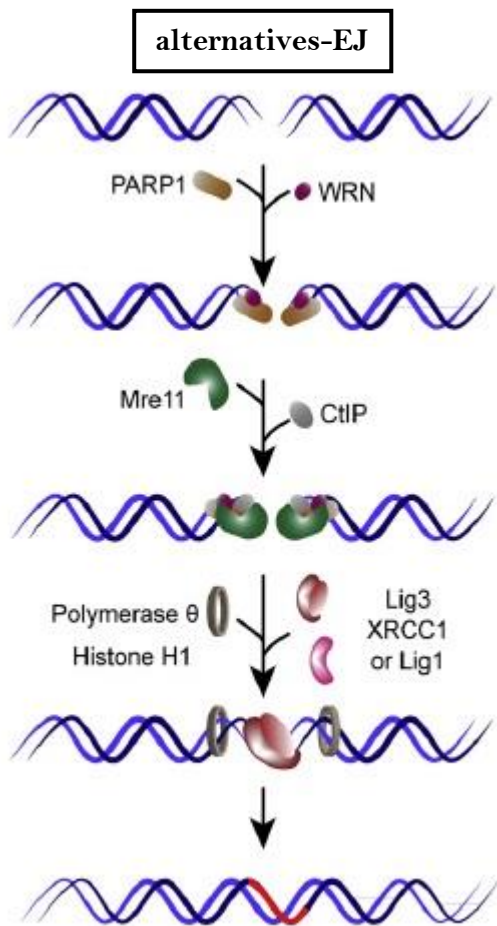


Abbildung 14: Modell der DSB-Reparatur über eine alternative Form der Endverknüpfung (alt-EJ). In diesem Fall wird PARP1 an die DNA-Enden rekrutiert, woraufhin eine limitierte Resektion der Bruchenden durch Mre11 und CtIP erfolgt. Schlussendlich werden die Bruchenden durch die Ligasen I und III sowie XRCC1 ligiert (modifiziert nach Iliakis et al. 2015).

Neben der zuvor beschriebenen HR und der klassischen, resektionsunabhängigen, DNA-PK-abhängigen Variante des NHEJ beschreiben Studien weitere Wege zur Reparatur von DSBs. Diese weisen Ähnlichkeiten zum oben aufgeführten c-NHEJ auf, werden jedoch durch Resektion gefördert. Als alternative Wege der Endverknüpfung (alt-EJ) bezeichnet, laufen diese viel langsamer ab als das oben erläuterte c-NHEJ (DiBiase, Zeng *et al.* 2000, Iliakis, Wang *et al.* 2004) und finden vor allem Anwendung, wenn die beiden Haupt-DSB-Reparaturmechanismen nicht zur Verfügung stehen (McVey und Lee 2008, Mladenov und Iliakis 2011). Eine Variante des alt-EJ, bei der nach der Resektion zufällige Mikrohomologien von wenigen Basenpaaren (2-4 Nukleotide) zur Stabilisierung genutzt werden (Mladenov, Magin *et al.* 2013), ist deshalb auch unter dem Namen Mikrohomologie-vermittelte End-Ligation (*microhomology mediated end-joining* = *MMEJ*) bekannt (Abbildung 14). Nach Iliakis (2009) sind die Faktoren PARP1 und PARP2 (*Poly- [ADP-Ribose] polymerase 1 und 2*) sowie Ligase III und XRCC1 (*X-rays repair cross complementing protein 1*) beteiligt. Da diese Reparatur nicht auf Basis einer homologen Matrize erfolgt, werden die DNA-Enden lediglich limitiert resektiert, was wie bei der HR durch den MRN-Komplex und CtIP erfolgt (Mansour, Rhein *et al.* 2010, Truong, Li *et al.* 2013). Die Polymerase θ scheint ebenfalls in diesem alt-NHEJ eine Rolle zu spielen, indem sie über ihre Helikase-Funktion den DNA-Doppelstrang aufwindet, um die resektierten Enden

freizulegen, sodass diese über Mikrohomologien ligiert werden können (Chan, Yu *et al.* 2010). In Anwesenheit des Ku-Heterodimers wird dieser alternative Weg des NHEJ unterdrückt (Wang, Wu *et al.* 2006) und verläuft daher auch im Gegensatz zum c-NHEJ DNA-PK unabhängig. Generell ist dieser Reparaturweg sehr fehlerbehaftet und führt oft zu Translokationen, kann jedoch während des gesamten Zellzyklus eingesetzt werden (Iliakis, Wang *et al.* 2004, Lieber 2010).

resektionsabhängiges c-NHEJ

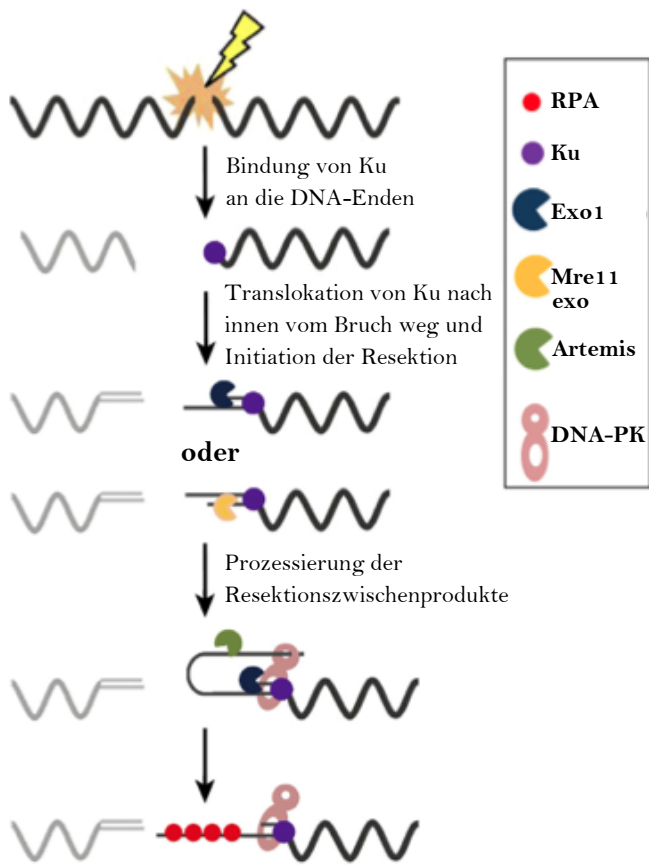


Abbildung 15: Modell des resektionsabhängigen c-NHEJ in G1. Nach Binden des Ku-Heterodimers an die DNA-Enden erfolgt die limitierte Resektion durch Mre11 und Exo1 sowie CtIP. Hierfür rückt Ku mutmaßlich etwas vom Bruch weg, um diese Resektion zu erlauben. Die gebildeten Sekundärstrukturen werden schlussendlich durch Artemis im Zusammenspiel mit DNA-PKCs aufgelöst und die Bruchenden durch die Ligase IV ligiert (modifiziert nach Löbrich und Jeggo 2017).

Ein anderer erst kürzlich von Biehs, Steinlage *et al.* (2017) beschriebener Weg DBSs zu reparieren ist die resektionsabhängige Form des c-NHEJ (Abbildung 15). Dieser ebenfalls langsame Reparaturmechanismus wurde speziell für G1-Phase-Zellen beschrieben. Aufgrund dessen, dass die Ligation der Enden in Anwesenheit des Ku-Heterodimers und der DNA-PKCs abläuft, jedoch limitierte Resektion aufweist, wurde er unter dem Namen resektionsabhängiges c-NHEJ bekannt. Nach dem Modell von Löbrich und Jeggo (2017) rückt Ku etwas nach innen vom Bruch weg, um die Resektion zu erlauben. Die Resektion wird auch in diesem Fall durch den Resektionsfaktor CtIP und die Nukleasen Mre11 sowie Exo1 durchgeführt. Nach der Aktivierung CtIPs durch dessen Phosphorylierung an Serin 327 und Threonin 847 durch Plk3 (Barton, Naumann *et al.* 2014) kann es zur Interaktion mit dem ebenfalls resektionsfördernden Faktor BRCA1 kommen. Infolge der limitierten Resektion entstehen Sekundärstrukturen, die durch die Endonuklease Artemis, welche mit der DNA-PKCs zu interagieren scheint, aufgelöst werden müssen. Die eigentliche Ligation wird wiederum durch die vom c-NHEJ bekannte Ligase IV durchgeführt.

1.6. Regulatorische Mechanismen der Wahl des DSB-Reparaturwegs

Zuvor wurden verschiedene Wege der DSB-Reparatur aufgezeigt. Doch welcher dieser Reparaturmechanismen wann zum Einsatz kommt, untersteht ausgeprägten regulatorischen Mechanismen, die auch heute noch Gegenstand der Forschung sind. Neben vorher erwähnten Faktoren wie Zellzyklus oder Chromatinstruktur, ist die Regulation der DNA-End-Prozessierung durch Resektion einer der ersten Schritte, die die Wahl des weiteren Mechanismus maßgeblich mitsteuert.

Die für exzessivere Resektion wichtige Nuklease Exo1 wird ausschließlich in S/G2 durch Cdk1/2 phosphoryliert, das dessen Rekrutierung an DSBs und die Interaktion mit BRCA1 verstärkt (Tomimatsu, Mukherjee *et al.* 2014). Aufgrund der fehlenden Cdk1/2-Aktivität in G1 und der daraus resultierenden fehlenden Exo1-Phosphorylierung durch Cdk1/2 in dieser Zellzyklusphase wirkt sich dies in G1 negativ auf die Resektion aus. In S/G2 hingegen wirkt die Exo1-Phosphorylierung durch Cdk1/2 resektionsfördernd und beeinflusst die

Wahl des Reparaturwegs so maßgeblich. Mit dem Eintritt in die S-Phase kommt es zur ebenfalls Cdk1-abhängigen Aktivierung des resektionsfördernden BRCA1/CtIP-Komplexes, der den Resektions-antagonisten RIF1 vom Bruch verdrängt. Cdk1-Aktivität wirkt in S/G2 stimulierend auf die Resektion (Symington und Gautier 2011), indem auch der Resektionsfaktor CtIP Cdk2- und ATM-abhängig an Serin 327 und Threonin 847 phosphoryliert und aktiviert wird (Sartori, Lukas *et al.* 2007, Escibano-Diaz, Orthwein *et al.* 2013). Dies wiederum führt zu einer verstärkten Interaktion mit BRCA1 und beeinflusst die Wahl des Reparaturwegs (Yu und Chen 2004, Huertas und Jackson 2009).

Diverse Studien beschreiben das antagonistische Zusammenspiel der Faktoren BRCA1 und 53BP1 (Bouwman, Aly *et al.* 2010, Bunting, Callen *et al.* 2010, Chapman, Sossick *et al.* 2012, Zimmermann, Lottersberger *et al.* 2013, Bakr, Kocher *et al.* 2016). Während BRCA1 zusammen mit CtIP Resektion fördert, nimmt 53BP1 im Komplex mit RIF1 eine resektionsantagonistische Wirkung ein (Chapman, Barral *et al.* 2013, Escibano-Diaz, Orthwein *et al.* 2013, Zimmermann, Lottersberger *et al.* 2013). Nach dem Modell von Escibano-Diaz, Orthwein *et al.* (2013) inhibiert RIF im Zusammenspiel mit 53BP1 die Akkumulation von BRCA1 in G1-Phase-Zellen. 53BP1 wird von ATM phosphoryliert (Daley und Sung 2013), woraufhin RIF1 rekrutiert wird und die DSB-Reparatur über den klassischen Weg des NHEJ gefördert wird (Chapman, Barral *et al.* 2013, Lottersberger, Bothmer *et al.* 2013), indem sie der DNA-End-Resektion entgegenwirken. Mit Eintritt in die S-Phase kommt es zur Aktivierung des BRCA1/CtIP-Komplexes durch Cdk-abhängige Phosphorylierung, wodurch RIF1 vom Bruch verdrängt und Resektion gefördert wird. In S/G2 wird der Großteil der resektierten Brüche über HR repariert. In G1 hingegen kommen resektionsabhängige Wege des NHEJ, wie alternative oder der oben beschriebene resektionsabhängige klassische Weg des NHEJ, zum Einsatz. Dass in G1 weniger Resektion stattfindet, liegt unter anderem an der niedrigen Aktivität Cyclin-abhängiger Kinasen wie Cdk1/2 in dieser Zellzyklusphase, die für die Aktivierung für die Resektion wichtiger Faktoren von entscheidender Bedeutung sind (Aylon, Liefshitz *et al.* 2004, Ira, Pellicioli *et al.* 2004, Jazayeri, Falck *et al.* 2006). Wird beispielsweise Exo1 als eichtige Nuklease für die Resektion überexprimiert, kann auch in G1 vermehrt Resektion beobachtet werden (Tomita, Matsuura *et al.* 2003, Limbo, Chahwan *et al.* 2007, Mimitou und Symington 2010, Shim, Chung *et al.* 2010). Ein weiterer Faktor, der sich negativ auf die Resektion auswirkt, ist Ku. So konnte in Ku-defizienten Zellen auch in G1 vermehrt Resektion bis 5 kb nachgewiesen werden (Barlow, Lisby *et al.* 2008, Clerici, Mantiero *et al.* 2008). Ebenfalls vermehrt RPA-positive Zellen zeigten Versuche von Tatyana Syzonenko in Ku-defizienten Mausfibroblasten nach hoch-LET-Bestrahlung mit Uranionen (^{238}U ; Primärenergie: 11,4 MeV/u; LET: 15.000 keV/ μm ; Fluenz: $3 \times 10^7 \text{ T./cm}^2$) und Induktion komplexer DNA-Schäden. Als komplexe Schäden werden Häufungen an DNA-Schäden in enger räumlicher Nähe bezeichnet, deren Reparatur eine enorme Herausforderung die für die Zelle darstellt. Per Definition spricht man wie zuvor bereits erwähnt nach Goodhead (1994) von gehäuften (*clustered*) DNA-Schäden, wenn zwei oder mehr DSBs in einem oder zwei helikalen Windungen der DNA auftreten. Mit steigendem LET nimmt die Komplexität der strahlungsinduzierten DNA-Schäden zu (Ward 1994). Im Gegensatz zu Röntgenbestrahlung, die im niedrig-LET Bereich anzusiedeln ist, konnte gezeigt werden, dass der Anteil an resektionspositiven Zellen in beiden Zellzyklusphasen LET-abhängig und demzufolge mit steigender Schadenskomplexität zunimmt (Yajima, Fujisawa *et al.* 2013, Averbek, Ringel *et al.* 2014) (Abbildung 16). Demzufolge kann davon ausgegangen werden, dass die Komplexität der induzierten

Schäden die Wahl des Reparaturwegs ebenfalls beeinflusst und sich die Reparatur der DSBs mit zunehmender Komplexität in Richtung resektionsabhängiger Mechanismen verschiebt.

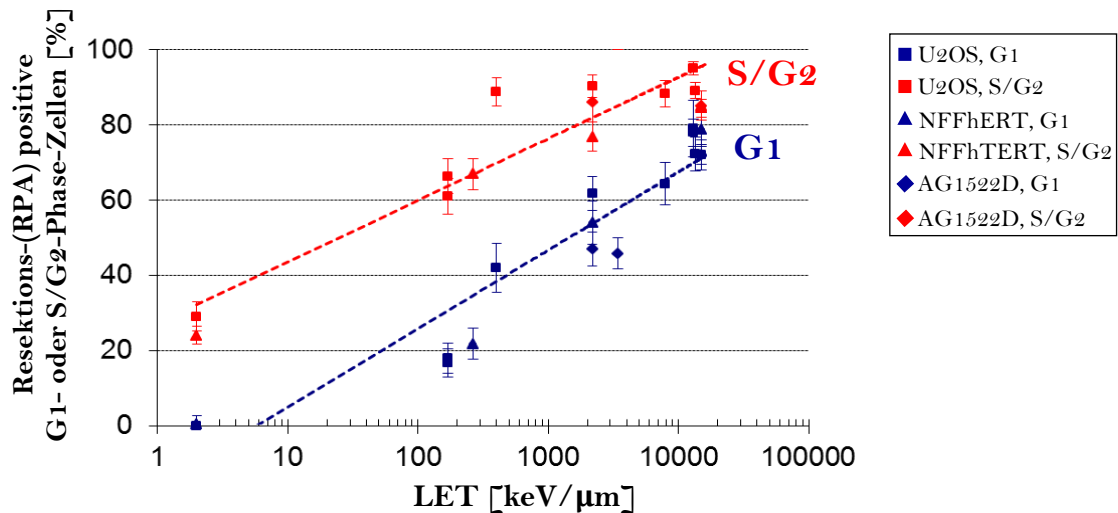


Abbildung 16: In Abhängigkeit des LET nimmt der Anteil an Resektions-positiven Zellen in beiden Zellzyklusphasen zu. Der Anteil an RPA-positiven Zellen aller untersuchten Zelllinien (AG122D (Raute), NFFhTERT (Dreieck) und U2OS (Quadrat)) nimmt mit steigendem LET sowohl in S/G2- (rot) als auch G1-Phase-Zellen (blau) zu (modifiziert nach Averbeck, Ringel et al 2014).

Nach Averbeck, Ringel *et al.* (2014) sind die Nukleasen Mre11, CtIP sowie Exo1 auch für die Resektion in G1 wichtig. DSB-Reparatur- und Überlebensanalysen dieser Studie nach Schwerionenbestrahlung offenbarten auch in G1 einen Reparatur- und Überlebensdefekt für CtIP-depletierte Zellen, das die Notwendigkeit resektionsabhängiger Reparatur nach Induktion komplexer DSBs deutlich machte. Die genauen Regulationsmechanismen der DNA-End-Resektion in G1, die Ermittlung relevanter Faktoren und bevorzugter Reparaturwege sind Gegenstand der Forschung und gilt es weiter zu untersuchen.

1.7. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Regulationsmechanismen der DNA-End Resektion in humanen G1-Phase-Zellen weiter zu untersuchen und hierfür essentielle Faktoren ausfindig zu machen. Frühere unter anderem auch in unserer Arbeitsgruppe erzielte Ergebnisse zeigten unabhängig der untersuchten Zellzyklusphase vermehrt Resektion nach Induktion komplexer DSBs durch hoch-LET-Bestrahlung (Yajima, Fujisawa *et al.* 2013, Averbeck, Ringel *et al.* 2014) (vgl. Abbildung 16). Die Inhibition des auch in G1 für die Resektion essentiellen Faktors CtIP führte wie zuvor bereits erwähnt zu einer beeinträchtigten DSB-Reparatur und einem schlechteren Überleben der bestrahlten Zellen (Averbeck, Ringel *et al.* 2014). Dies belegte die Wichtigkeit der DNA-End-Prozessierung durch Resektion nach hoch-LET-Bestrahlung und Induktion komplexer Schäden. Diverse Veröffentlichungen konnten ein antagonistisches Zusammenspiel des resektionsfördernden Komplexes BRCA1/CtIP und des der Resektion entgegenwirkenden 53BP1/RIF1-Komplexes zeigen, welche beide bei der Regulation der Resektion von entscheidender Bedeutung sind (Bouwman, Aly *et al.* 2010, Bunting, Callen *et al.* 2010, Chapman, Sossick *et al.* 2012, Zimmermann, Lottersberger *et al.* 2013, Bakr, Kocher *et al.* 2016).

Frühere Arbeiten in unserer Gruppe von Tatyana Syzonenko befassten sich mit den Auswirkungen des Resektionsantagonisten RIF1 auf die DNA-End-Resektion nach hoch-LET-Bestrahlung. Diese ließen jedoch keine entscheidende Rolle von RIF1 bei der Resektionsregulation nach Induktion komplexer DSBs erkennen. Vielmehr wiesen ihre Ergebnisse auf eine Bedeutung von BRCA1 für die Resektion in G1 hin (Dissertation Tatyana Syzonenko 2017).

Nach Yu, Fu *et al.* (2006) wird der Resektionsfaktor CtIP durch die N-terminale RING-Domäne von BRCA1 ubiquitiniert. Zusammen mit der Tatsache, dass der Resektionsfaktor CtIP für die DSB-Reparatur und das Überleben der Zellen nach Ionenbestrahlung auch in G1 eine entscheidende Rolle einnimmt (Averbeck, Ringel *et al.* 2014), könnte die Ubiquitinierung des Resektionsfaktors eine Möglichkeit darstellen Resektion in G1 zu regulieren. Nach Schmidt, Galanty *et al.* (2015) ist die posttranslationale Modifikation durch Ubiquitinierung von CtIP für dessen Rekrutierung in S/G2 von entscheidender Bedeutung und beeinflusst auf diesem Wege die Resektion. Die Ubiquitin-Ligase, welche in S/G2 beschrieben wird, CtIP zu ubiquitinieren, ist die E3 Ubiquitin-Ligase RNF138. Dieselbe Ubiquitin-Ligase nimmt nach Ismail, Gagne *et al.* (2015) Einfluss auf die Resektion, indem sie in S/G2 den Resektionsantagonisten Ku80 ubiquitiniert und so dessen Ablösung vom Schaden fördert und exzessivere Resektion erlaubt. Andere Veröffentlichungen schrieben die Modifikation von Ku80 durch Ubiquitinierung einer anderen Ubiquitin-Ligase, RNF8, zu (Feng und Chen 2012). Nach Ismail, Gagne *et al.* (2015) ist RNF8 zudem die Ubiquitin-Ligase, welche in G1-Phase-Zellen agiert. Aber auch an der Regulation des Resektionsantagonisten 53BP1 ist RNF8 beteiligt. Die Ubiquitinierung von 53BP1 durch RNF8 im Zusammenspiel mit RNF168 gilt als Voraussetzung für die Bindung und Regulation des proteosomalen Abbaus von 53BP1 (Huen, Grant *et al.* 2007, Bohgaki, Bohgaki *et al.* 2013, Hu, Wang *et al.* 2014).

Alle diese Studien verdeutlichten die Relevanz der Proteinmodifikation durch Ubiquitinierung von Faktoren, die für die Regulation der Resektion nicht nur in S/G2, sondern auch in G1, von wichtiger Bedeutung sind. Daher wurden in dieser Arbeit Ubiquitinierungsprozesse nach Induktion komplexer Schäden mit dem Ziel die Resektionsregulation in G1 näher zu untersuchen und relevante Faktoren und Modifikationen zu ermitteln, genauer betrachtet.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Gerät	Hersteller, Ort
Agarosegelelektrophoresekammern	Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen
Alphaquelle	Eckert & Ziegler, Berlin
Binokular	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Bioruptor™ UCD-200	Diagenode, Denville USA
Cell Sorter S3e	BioRad, München
Cool Cam 1	MetaSystems, Altlußheim
Dosimeter Röntgenröhre	PTW-Freiburg, Freiburg
EMCCD Kamera	Andor Bioimaging Division, USA
Fusion-FX Vilber Lourmat	Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen
Gelelektrophoresekammer	BioRad, München
Horizontalschüttler	Edmund Bühler, Hechingen
Inkubator, BBD 6220 Heraeus	Kendro Laboratory Products, Langenselbold
Inkubator New Brunswick Galaxy 170S	New Brunswick (Eppendorf), Hamburg
IQ50-SA Smart Shutter	Sutter Instrument, Novato USA
Kryotank, Thermolyne Locator 8 Plus	Cryo Biological Storage System Atlantic Lav Equipment, Flemington
Laser MNL 100	LTB Lastertechnik, Berlin
Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikroplattenleser	Biotek, Bad Friedrichshall
Mikroskop (konfokal), Leica TCS SPE	Leica Mikrosystems, Wetzlar
Mikroskop (konfokal), Nikon Ti	Nikon GmbH, Düsseldorf
Mikroskop (konfokal), Carl Zeiss Axio Imager 2	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Mikroskop Leica DM LA	Leica Mikrosystems, Wetzlar
Laser Microdissection System (LMD)	Leica Mikrosystems, Wetzlar
Mikrowelle Severin Microwave 800	Severin, Sundern
Netzteil für Elektrophorese	Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen
Pipettierhilfe	Brand, Wertheim

Gerät	Hersteller, Ort
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipette Stepper, Multistep	Brand, Wertheim
Rotationsschüttler	Phoenix Instruments, Garbsen
Röntgenröhre Isovolt Titan 320	GE Sensing & Inspection Technologies, Ahrensburg
Stereomikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Sterilwerkbank, HSP 12 HeraSafe®	Kandro, Laboratory Products, Langenselbold
Trans-Blot® Turbo™ Instrument	BioRad, München
UV-Tisch	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Vortexer	VWR International, Darmstadt
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zellzähler, Z2 Coulter Counter	Beckmann Coulter, Krefeld
Zellzähler, TC20™ Automated Cell Counter	BioRad, München
Zentrifuge, Sigma 3-18K	Fisher Bioblock Scientific, Schwerte
Zentrifuge, Heraeus™ Laborzentrifuge™ 400 Centrifuges	Thermo Scientific, Braunschweig

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Ort
25 G Kanüle, Terumo Neolus	Thermo Corporation, Waltham
4-15% Mini-Protean® TGX™ Precast Protein Gels, 15-well, 15 µl	BioRad, München
7,5% Mini-Protean® TGX™ Precast Protein Gels, 15-well, 15 µl	BioRad, München
10% Mini-Protean® TGX™ Precast Protein Gels, 15-well, 15 µl	BioRad, München
10% Mini-Protean® TGX™ Precast Protein Gels, 10-well, 30 µl	BioRad, München
10% Mini-Protean® TGX™ Precast Protein Gels, 10-well, 50 µl	BioRad, München
96 Well Mikrotiterplatte Nunc	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Alpha-Kammern	GSI Werkstatt, Darmstadt
Coultergefäße	Geriner Bio-One, Frickenhausen
Counting Slides, Dual Chamber for Cell Counter	BioRad, München
Deckgläschen 18 x 18 mm, quadratisch	VWR International, Darmstadt

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Ort
Deckgläser 24 x 24 mm, quadratisch	VWR International, Darmstadt
Deckgläser 40 mm, rund	Thermo Scientific, Braunschweig
Einmalspritze	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Glaspipetten EM Techcolor	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Multistep-Pipettenspitzen	Brand, Wertheim
Plasma-behandelte Mylar-Folie (boPET = biaxial orientierte Polyester-Folie)	Max-Planck Institut, Halle
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare, Chicago / BioRad, München
Objektträger	VWR International, Darmstadt
Pasteurpipetten	VWR International, Darmstadt
Pipettenspitzen 1000 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen 100 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 5,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Sterile Röhrchen	TPP, Trasadingen
Trans-Blot® Turbo™ RTA Midi Nitrocellulose Transfer Kit	BioRad, München
Whatman Filterpapier	Schleicher & Schuell
Zellkulturflaschen BD Falcon T25	BD Bioscience
Zellkulturflaschen BD Falcon T75	BD Bioscience
Zellkulturschalen 3,5 cm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen 6 cm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen 10 cm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen 30 cm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	TPP, Trasadingen

2.1.3. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller, Ort
100 bp DNA Ladder	AppliChem, Darmstadt

Chemikalien	Hersteller, Ort
6x Loading Dye	Fermentas, Waltham
Aceton	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Accutase	Sigma Aldrich, St. Louis
Agar-Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Agarose Low Melt	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Chloroform	AppliChem, Darmstadt
DAPI	AppliChem, Darmstadt
Deconex 53 plus	Borer, Zuchwil
DMSO	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Dulbecco's MEM	Biochrom AG, Berlin
EDTA	AppliChem, Darmstadt
EdU	Carl Roth's ROTI®kit für Imaging (EdU Click), Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Ethanol (99,8%)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Fötales Serum Albumin (FCS)	Biochrom AG, Berlin
GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder	Fermentas, Waltham
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas, Waltham
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Hepes	Merck, Darmstadt
Immersionsöl	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
KOD Hot Start DNA Polymerase	Novagen (Merck), Darmstadt
LB-Agar	AppliChem, Darmstadt
LB-Medium	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Löfflers Methylenblau	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid - Hexahydrat	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe

Chemikalien	Hersteller, Ort
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Natrium-Azid	Sigma-Aldrich, St. Louis
Natriumbutyrat	Calbiochem (Merck), Darmstadt
Natrium-Chlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis
PageRuler™Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, Waltham
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
PBS-Pulver	Biochrom AG, Berlin
Pipes	Sigma-Aldrich, St. Louis
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30%	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
RotiSafe	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Saccharose	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Sucrose	Sigma-Aldrich, St. Louis
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
SlowFade	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), Waltham
TEMED	Merck, Darmstadt
Tris-Base	AppliChem, Darmstadt
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Triton-X-100	AppliChem, Darmstadt
Tween20	AppliChem, Darmstadt

2.1.4. Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
3x Reducing Blue Loading Dye	3x Blue LoadingDye 10% DTT
CSK-Puffer	10 mM Pipes pH 7,0 100 mM NaCl 300 mM Sucrose 3 mM MgCl ₂ 0,7% Triton-X-100

Puffer	Zusammensetzung
CSK+R-Puffer	CSK-Puffer 0,5 mg/ml RNaseA (R4875 von Sigma gelöst in Millipore-H ₂ O)
DAPI-Lösung	1 µg/ml DAPI in PBS ^{-/-}
EdU	10 mM EdU in DMSO
Hoechst-Lösung	1 mM Hoechst 33342 in PBS ^{-/-}
IP-Lysepuffer	20 mM Tris-HCl pH 8,2 150 mM NaCl 1% Triton-X-100 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail pro 10 ml 1 Tablette Phospho-Stop pro 10 ml 5 mM Natriumbutyrat 50 µM PR619 5 mM 1,10-Phenanthrolin
2x Lämmli-Lysepuffer	100 mM Tris-HCl pH 6,8 2% SDS 20% Glycerin
1x Laufpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 0,1% SDS
1x Methylenblau	10% (v/v) Löfflers Methylenblau 5% (v/v) Methanol 0,09% (w/v) Kaliumhydroxid
PBS ^{-/-}	2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 7,9 mM Na ₂ HPO ₄
PBS-T	0,1% Tween 20 in PBS ^{-/-}
2% PFA in PBS ^{-/-}	2 g Paraformaldehyd in 100 ml PBS ^{-/-}
4% PFA in PBS ^{-/-}	4 g Paraformaldehyd in 100 ml PBS ^{-/-}

Puffer	Zusammensetzung
50x TAE Puffer	242 g Tris-Base 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 mit Millipore-H ₂ O auf 1000 ml aufgefüllt
10x TBS-Puffer	1,37 M NaCl 200 mM Tris-Base pH-Wert mit konz. HCl auf 7,6 eingestellt
1x TBS-T-Puffer	1x TBS pH 7,6 0,1% Tween20
1x Turbo Transfer-Puffer	200 ml 5x Turbo Transfer Puffer (BioRad) 700 ml Millipore-H ₂ O 200 ml Ethanol (unvergällt)

2.1.5. Zellkulturmedien und Zusätze

Zusätze und Lösungen	Hersteller, Ort
Accutase	Sigma-Aldrich, St. Louis
DMEM (4,5 g/l Glucose)	Biochrome, Berlin
FCS	Biochrome, Berlin
Fibro-Trypsin (Trypsin-Lösung 0,05% mit 0,02% EDTA)	PAN Biotech, Aidenbach
nicht-essentielle Aminosäuren (<i>non-essential amino acids, NEAA</i>)	Biochrome, Berlin

angesetztes Zellkulturmedium	Zusammensetzung
Kulturmedium für CJhTERT-Zellen	DMEM (4,5 g/l Glc) 15% FCS 1% NEAA 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

angesetztes Zellkulturmedium	Zusammensetzung
Kulturmedium für 82-6hTERT-, U2OS- und HeLa.S-Fucci-Zellen	DMEM (4,5 g/l Glc) 10% FCS
Kulturmedium für U2OS- und HeLa.S-Fucci-RNF138-KO-Zellen	DMEM (4,5 g/l Glc) 10% FCS 1 µg/ml Puromycin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

2.1.6. Biochemische Kits

Biochemisches Kit	Hersteller, Ort
Carl Roth's ROTI®kit für Imaging (EdU Click-594)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Carl Roth's ROTI®kit für Imaging (EdU Click-647)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
DC Protein Assay	BioRad, München
HiPerFect Transfection	Qiagen, Hilden
jetPRIME Transfection	Polyplus Transfection, Illkirch, France
<i>Magnetic Beads</i> TUBE2	LifeSensors, Malvern, PA
MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit	Epicentre (Merck), Darmstadt
PCR Mycoplasmen Testkit	AppliChem, Darmstadt
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Pierce™ ECL plus Westernblotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Pierce™ Anti-DYKDDDDK Magnetic Agarose	Thermo Fisher Scientific, Waltham
<i>Protein G Magnetic Dynabeads</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden

2.1.7. Primäre Antikörper

Epitop	Hersteller	Konzentration [mg/ml]	Verdünnung	Spezies	Verwendung
53BP1 (ab36823)	Abcam	1	1:5000	rabbit polyclonal	WB
53BP1 (Ab-1) (PC712)	Calbiochem / Oncogene	2	1:500	rabbit polyclonal	IF
Artemis	Invitrogen	0,78	1:1000	rabbit polyclonal	WB

Epitop	Hersteller	Konzentration [mg/ml]	Verdünnung	Spezies	Ver- wendung
γH2AX (Ser139) clone JBW301 (05-636)	Millipore		1:500	mouse monoclonal	IF
CtIP (A300-488A)	Bethyl Laboratories	1	1:100	mouse monoclonal	IF
CtIP (A300-488A)	Bethyl Laboratories	1	10 µl	mouse monoclonal	IP
CtIP (D-4) sc271339	Santa Cruz		1:100	mouse monoclonal	WB
CtIP (D-4) HRP sc271339 HRP	Santa Cruz		1:100	mouse monoclonal	WB
CENP-F	Novus Biologicals		1:750	rabbit polyclonal	IF
Cyclin A (MAB3680)	Millipore		1:400	mouse monoclonal	WB
FLAG M2 (F3165)	Sigma	5	1:2000	mouse monoclonal	WB
GAPDH (GT293) (GTX627408P)	Biozol	1	1:5000	mouse monoclonal	WB
Geminin (1A8) H00051053- M01	Novus Biologicals		1:100	mouse monoclonal	IF
Ku80 (111) MA5-12933	Thermo Scientific	0,2	1:100	mouse monoclonal	IF
Ku80 (111) MA5-12933	Thermo Scientific	0,2	1:200	mouse monoclonal	WB
Ku80 (ab1357)	Chemicon		7,5 µl	rabbit polyclonal	IP
Mouse (G3A1) mAb IgG1 Isotype Control (#5415)	Cell Signaling	2,5			IP
Normal Rabbit IgG Control (#2729)	Cell Signaling	1			IP
p97 (VCP)	Thermo Fisher		1:2000	mouse monoclonal	WB
RPA/p34 clone 9H8 (R1280)	Sigma	2,2	1:3000	mouse monoclonal	IF
RPA32 phospho (S4/S8) (A300-245)	Bethyl Laboratories		1:5000	rabbit polyclonal	WB
Rad51 (ab63801)	Abcam		1:2000	rabbit polyclonal	WB
RNF8 (#09-813)	Millipore	1		rabbit polyclonal	WB
RNF138 (SAB4502131)	Sigma	1	1:1000	rabbit polyclonal	WB
RNF138-Biotin	AntibodyGe nie / Biomol	0,25	1:250		WB
TUBE2-Biotin (UM302)	LifeSensors		1:5000		WB
Tubulin (11H10) #9099 HRP conjugated	Cell Signaling	2	1:1000	rabbit monoclonal	WB
Tubulin (T5168)	Sigma		1:10.000	mouse monoclonal	WB
UBE2D1 [EPR13000(B)] (ab176561)	Abcam		1:10.000	rabbit monoclonal	WB
Vinculin (ab18058)	Abcam	0,2	1:5000	mouse monoclonal	WB

2.1.8. Sekundäre Antikörper

Fluorophor- /Chromophor-host- α - Epitop	Hersteller	Konzentration [mg/ml]	Verdünnung	Spezies	Verwendung
Alexa 488 donkey- α -mouse	Molecular Probes (Invitrogen)	2	1:400	donkey	IF
Alexa 488 goat- α -mouse	Life Technologies	2	1:400	goat	IF
Alexa 488 donkey- α -rabbit	Life Technologies	2	1:400	donkey	IF
Alexa 488 goat- α -rabbit	Life Technologies	2	1:400	goat	IF
Alexa 568 donkey- α -mouse	Molecular Probes (Invitrogen)	2	1:400	donkey	IF
Alexa 568 goat- α -mouse	Life Technologies	2	1:400	goat	IF
Alexa 568 donkey- α -rabbit	Life Technologies	2	1:400	donkey	IF
Alexa 568 goat- α -rabbit	Life Technologies	2	1:400	goat	IF
ATTO 647 goat- α -mouse	Sigma- Aldrich	1	1:200	goat	IF
HRP- α -mouse kappa light chain (ab99617)	Abcam		1:10.000	rat	WB
HRP- α -rabbit IgG light chain (ab99697)	Abcam		1:1000	mouse	WB
HRP Veriblot for IP (ab131366)	Abcam		1:1000	mouse	WB
Poly-HRP- α -mouse	Thermo Scientific		500	goat	WB
Poly-HRP- α -rabbit	Thermo Scientific		500	goat	WB
Streptavidin-HRP	Thermo Scientific		500		WB

2.1.9. siRNA

Gen	Hersteller, Ort	Sequenz (5'-3')
h53BP1	Eurofins Genomics, Ebersberg Mycrosynth, Balgach	5'-GAACGAGGAGACGGUAAUA-3' (nach (DiTullio, Mochan <i>et al.</i> 2002))
hRNF8	Eurofins Genomics, Ebersberg Mycrosynth, Balgach	5'-CAGAGAAGCUUACAGAUGUUU-3' (nach (Ismail, Gagne <i>et al.</i> 2015))
hRNF138	Eurofins Genomics, Ebersberg Mycrosynth, Balgach	5'-CCUGUGUCAAGAAUCAAU-3' (nach (Ismail, Gagne <i>et al.</i> 2015))
hRNF138	Eurofins Genomics, Ebersberg Mycrosynth, Balgach	5'-GGAAUAAUCCAAAGGAAU-3' (nach (Schmidt, Galanty <i>et al.</i> 2015))
hUBE2D1	Eurofins Genomics, Ebersberg Mycrosynth, Balgach	5'-CAACAGACAUGCAAGAGAA-3' (nach (Schmidt, Galanty <i>et al.</i> 2015))

2.1.10. Plasmide

Plasmid	Box	Backbone Vektor	Resistenzen	Größe [bp]	eingesetzte Konzentration
pEGFP-RNF138- WT*	L19	pEGFP-C1	Kanamycin, Neomycin	5472	2 µg / 3,5 cm PD
pmCherry-C1-CtIP	G13	pmCherry-C1	Kanamycin, Neomycin	7400	3 µg / 3,5 cm PD
pSpCas9(BB)-2A-Puro	K08	pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)	Ampicillin	9204	0,1 µg in Ligation
pSpCas9(BB)-2A-Puro-hRNF138	M06	pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)	Ampicillin	9204	2 µg / 3,5 cm PD
RNF138-WT-FLAG	M11	pEGFP-C1	Kanamycin, Neomycin	4782	2 µg / 3,5 cm PD

* pEGFP-RNF138-WT was a gift from Michael Hendzel (Addgene plasmid # 78920 ; <http://n2t.net/addgene:78920> ; RRID:Addgene_78920)

2.1.11. Oligonukleotide / Primer

Oligonukleotid	Template Strang	Sequenz [5' – 3']	Tm [°C]	Länge [bp]	Produktlänge [bp]
CB_C1_FLAG_fw*	plus	phos-GATGACGACAAGTCCGG ACTCAGATCTCGA	69,5	30	} 4781
CB_C1_FLAG_rev*	minus	phos-GTCTTTGTAGTCCATGG TGGCGACCGGTA	69,5	29	
EGFP-BamH1_fw	plus	GGTGAGCAAGGGCGAGG	58,0	17	796 (mit CB_hRNF 138 top_2 als rev Primer)
CB_C1_hRNF138- FLAG_Seq	plus	CACGGGGATTTCCTCAAGTCT	65,0	19	} 1364
CB_hRNF138_1 primer fw	plus	GTTAGGGGCGGATAAGCACA	59,4	20	
CB_hRNF138_1 primer rev	minus	GAGGGGAAGTTACAGAAGAG	57,3	20	
CB_hRNF138_2 primer fw	plus	GCCTCGGCTGCGAAGATA	58,2	19	} 1139
CB_hRNF138_2 primer rev	minus	ATCCCTGCAATTCCTCCCG	58,8	18	
CB_hRNF138_Seq		GCTGTATCCTGATGCGATCC		20	
T7-sgRNF138 #2_fwd**	plus	TAATACGACTCACTATAAGG ATCATCTTCGGTGTAGGACG	71,5	40	} 138
CB_T7-sgR_rev***	minus	AAAAGCACCGACTCGGTGCC	61,4	20	
NA_pX459_seq_rev	minus	AGAGTGAAGCAGAACGTG	59,8	18	} 514
CB_hRNF138 top_2 ****	plus	phos-caccGATCATCTTCGGTGT AGGACGTGG	66,3	25	
CB_hRNF138 bottom_2 ****	minus	phos-aaacCGTCCTACACCGAAGA TGATCACC	63,0	25	
CB_hRNF138 top_1 ****	plus	phos-caccGCAAAACGCCCCGTGC GGACCACGG	71,2	25	

Oligonukleotid	Template Strang	Sequenz [5' – 3']	Tm [°C]	Länge [bp]	Produktlänge [bp]
CB_hRNF138 bottom_1 ****	minus	phos- aaac TGGTCCGCACGGGCG TTTTG CGCC	67,9	25	
<p>* C-terminale FLAG-Sequenz</p> <p>* N-terminale FLAG-Sequenz (komplementär)</p> <p>** <u>minimale T7 Promotorsequenz, die für eine effiziente Transkription benötigt wird.</u></p> <p>** dieses Guanin wurde hinzugefügt, da die letzten drei Guanins der T7 Promotorsequenz die ersten Basen sind, die transkribiert werden.</p> <p>** diese Basenabfolge entspricht der gRNA Sequenz (CB_hRNF138 top_2)</p> <p>*** die Sequenz des T7-sgR_rev liegt auf dem PX459 Vektor</p> <p>**** PAM Motif (nicht Teil der 20-nt guide Sequenz der sgRNA, jedoch direkt 3' dieser 20-nt Zielsequenz)</p> <p>**** diese Base ist nicht Teil der humanen RNF138 Sequenz, wurde jedoch für die Transkription am U6 Promotor des Cas9 Vektors hinzugefügt.</p> <p>**** diese Basen wurden für die Klonierung in die BbsI Schnittstelle des pSPCas9(BB)-2A-Puro hinzugefügt.</p>					

2.1.12. Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller, Ort	Lösungsmittel	eingesetzte Konzentration
1,10-Phenanthrolin	LifeSensors, Malvern, PA	IP Lysepuffer	5 mM
Aphidicolin	Sigma-Aldrich, St. Louis	DMSO	3 µg/ml
B02	Cayman Chemicals, Hamburg	DMSO	50 µM
MG132	Adipogen, Liestal	DMSO	10 µM
Natriumbutyrat	Sigma-Aldrich, St. Louis	Millipore-H ₂ O	5 mM
NMS873	Cayman Chemicals, Hamburg	DMSO	50 µM
NU7441	Tocris, Wiesbaden	DMSO	7,5 µM
PhosphoStop	Roche, Mannheim	IP Lysepuffer	1 Tablette in 10 ml
Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim	IP Lysepuffer	1 Tablette in 10 ml
PR619	LifeSensors, Malvern, PA	IP Lysepuffer	50 µM
RNaseA	Millipore	Millipore-H ₂ O	0,5 mg/ml

2.1.13. Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller, Ort	eingesetzte Konzentration
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis	100 µg/ml

Antibiotikum	Hersteller, Ort	eingesetzte Konzentration
Kanamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis	30 µg/ml
Penicillin	Biochrome, Berlin	100 U/ml
Puromycin	Sigma-Aldrich, St. Louis	1 µg/ml
Streptomycin	Biochrome, Berlin	100 mg/ml

2.1.14. Enzyme

Enzym	Hersteller, Ort	eingesetzte Konzentration	verwendete Temperatur [°C]
<i>Bam</i> HI	New England Biolabs (NEB), Frankfurt	20 U/µl	37
Benzonase	New England Biolabs (NEB), Frankfurt	20 U/µl	4
<i>Bpi</i> I (<i>Bbs</i> I)	Thermo Scientific, Waltham	10 U/µl	37
Cas9 Nuklease	New England Biolabs (NEB), Frankfurt	30 nM	37
DNase	New England Biolabs (NEB), Frankfurt	20 U/µl	37
KOD Hot Start DNA Polymerase	Novagen (Merck), Darmstadt	0,01 U/µl	abhängig von den verwendeten Primern
Proteinkinase K	Epicentre (Biozym), Hessisch Oldendorf	2 mg/ml	65
Reverse Transkriptase	Qiagen, Hilden	1:20	42
RNase R4875	Sigma (Merck), Darmstadt	0,5 mg/ml (in Millipore)	37
T4 DNA Ligase	New England Biolabs (NEB), Frankfurt	1:20	16
T7 RNA Polymerase	New England Biolabs (NEB), Frankfurt	0,5 U/µl	37
Top Taq Polymerase	Qiagen, Hilden	0,01 U/µl	abhängig von den verwendeten Primern
Quick T4 DNA Ligase	New England Biolabs (NEB), Frankfurt	1:20	16

2.1.15. Software

Programm	Hersteller, Ort
Andor IQ	Andor Bioimaging Division, USA
EndNote X9	EndNote, Philadelphia, USA
Fusion-FX	Vilber Lourmat, Eberhardzell
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, San Diego, USA

Programm	Hersteller, Ort
Huygens Essential	Scientific Volume Imaging, Hilversum, Niederlande
Gen5	Biotek Instruments, Bad Friedrichshall
ImageJ 1.47v	Wayne Raband, national Institutes of Health, USA
Laser Microdissection	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar
Leica LAS LF	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar
Metafer 4 V3.11.8	MetaSystems, Altlußheim
MetaCyte	MetaSystems, Altlußheim
Microsoft Office 2010 Excel	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Microsoft Office 2010 PowerPoint	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Microsoft Office 2010 Word	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
OriginPro 9	Originlab Corporation, Northampton, USA

2.1.16. Zelllinien

82-6hTERT

82-6 hTERT Zellen sind humane Fibroblasten, die durch das Einführen der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase Reversen Transkriptase (hTERT) über einen Vektor immortalisiert wurden, um zu verhindern, dass die Zellen in einen Status übergehen, in dem sie sich nicht mehr teilen, die sogenannte Replikative Seneszenz (Bodnar, Ouellette *et al.* 1998, Rubio, Kim *et al.* 2002, Pirzio, Freulet-Marriere *et al.* 2004). Die Fibroblasten wurden in DMEM (4,5 g/l Glucose) kultiviert, dem 10% FCS zugesetzt wurden. Freundlicherweise wurden uns die Zellen von Prof. Dr. M. Löbrich (Technische Universität Darmstadt) bereitgestellt.

CJhTERT

CJhTERT Zellen sind ebenfalls humane Fibroblasten, deren Telomerase über die Integration von hTERT inaktiviert wurde. Zudem weisen diese Zellen Deletionen im Artemis-Gen auf, weshalb sie das Artemis-Transkript nicht exprimieren und demzufolge Artemis-defizient sind. Kultiviert werden diese Fibroblasten in DMEM (4,5 g/l Glucose), dem 15% FCS, 1% nicht-essentielle Aminosäuren (*non-essential amino acids, NEAA*) und 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden. Auch diese Zelllinie wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. M. Löbrich (Technische Universität Darmstadt) bereitgestellt und stammt ursprünglich aus dem Labor von Prof. Dr. P. Jeggo (Universität in Sussex, UK) (Riballo, Kuhne *et al.* 2004).

U2OS

U2OS-Zellen auch als 2T Linie bekannt wurden aus dem Knochengewebe eines 15-jährigen Mädchens kultiviert, das unter einem Osteosarkom litt. Bereits 1964 wurden die ursprünglichen Zellen aus dem mäßig differenzierten Sarkom des Schienbeins etabliert. Kultiviert werden U2OS-Zellen in DMEM (4,5 g/l Glucose), dem 10% FCS zugesetzt wurden. Die Verdopplungszeit der Zellen beträgt etwa 28 Stunden (Niforou, Anagnostopoulos *et al.* 2008).

HeLa

HeLa Zellen sind humane Epithelzellen des Zervixkarzinoms der afroamerikanischen Patientin Henrietta Lacks aus dem Jahr 1951. Sie waren vom humanen Papillomvirus 18 (HPV18) befallen und wiesen mehrere Mutationen auf. Unter anderem waren die Onkogene E6 und E7 mutiert, wodurch der Tumorsuppressor p53 inaktiviert war. HeLa-Zellen waren die ersten menschliche Zelllinie aus denen eine permanente Zelllinie etabliert wurde (Lucey, Nelson-Rees *et al.* 2009).

Hela.S-Fucci

Hela.S-Fucci Zellen sind HeLa Zellen in die das Fucci-System stabil integriert wurde. Dieser Fluoreszenz Ubiquitin-basierte Indikator erlaubt es G1- und/oder S-/G2-/M-Phasen des Zellzyklus einfach zu unterscheiden. Fucci besteht einerseits aus dem orange fluoreszierenden monomeren Kusabira-Orange2 (mKO2), an das ein Fragment des humanen Cdt1 Gens (Aminosäuren 30-120) gekoppelt ist und daher G1-Phasen anzeigt. Andererseits wurde ein Fragment des humanen Geminins (Aminosäuren 1-110) mit dem grün fluoreszierenden monomeren Azami-Grün1 (mAG1) Protein fusioniert, um S-/G2-/M-Phasen zu visualisieren (Abbildung 17).

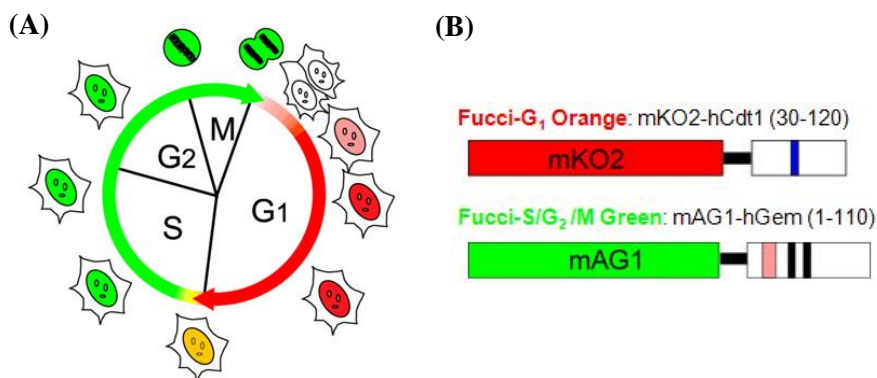


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Fucci-Zellzyklus sowie des Fucci-Konstrukts. Während Fucci-G1-Orange G1-Phase-Zellen anhand der Cdt1-Expression orange markiert, werden Nuklei der S-/G2-/M-Phasen über Geminin-Expression grün dargestellt. Frühe S-Phasen erscheinen aufgrund der noch vorhandenen Cdt1-Expression und gleichzeitigen Geminin-Expression gelb (modifiziert nach Sakaue-Sawano, Kurokawa *et al.* 2008).

Cdt1 wird vom Ubiquitin-Ligase-Komplex SCF skp2 ubiquitiniert und während der S- und G2-Phase vom Proteasom abgebaut. Geminin hingegen wird während der M- und G1-Phase vom E3 Ligase Komplex APCcdh1 ubiquitiniert und folglich vom Proteasom abgebaut, weshalb es sich als S-/G2-/M-Phase Marker eignet. Mit

Hilfe des Fucci-Systems können demnach Zellzyklusphasen visualisiert werden, in denen Geminin oder Cdt1 nicht vom Proteasom abgebaut werden (Mechali und Lutzmann 2008, Newman und Zhang 2008, Sakaue-Sawano, Kurokawa *et al.* 2008). mAG1 hat ein Anregungsmaximum bei 492 nm und das Emissionsmaximum liegt bei 505 nm. Für mKO2 liegt das Anregungsmaximum bei 551 nm und das Emissionsmaximum bei 565 nm (Abbildung 18) (Sakaue-Sawano, Kurokawa *et al.* 2008).

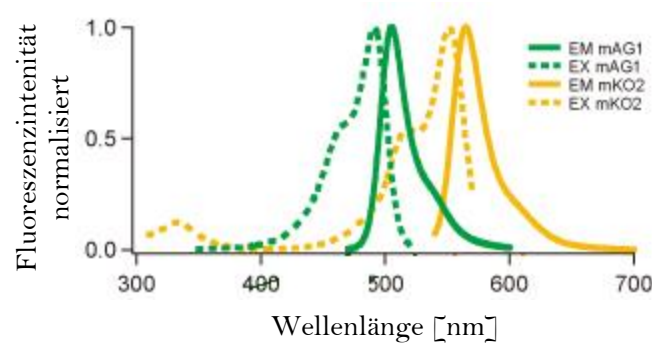


Abbildung 18: Darstellung der Anregungs- und Emissionsmaxima der beiden im Fucci-System verwendeten fluoreszierenden Proteine Kusabira-Orange2 (mKO2) und Azami-Grün1 (mAG1) (modifiziert nach Sakaue-Sawano, Kurokawa *et al.* 2008).

Die HeLa.S-Fucci Zelllinie wurde uns freundlicherweise vom *RIKEN BRC* über das *National Bio-Resource Project of the MEXT, Japan* bereitgestellt.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkulturtechnik

2.2.1.1. Zellpassage

Zur Erhaltung der Teilungsfähigkeit einer Zellkultur wird diese bei einer Konfluenz von 70%-80% in der Regel ein- bis zweimal pro Woche passagiert. Um eine mögliche Kontamination der Zellen auszuschließen, werden die Zellen vor Beginn mittels eines Phasenkontrastmikroskops auf Reinheit, Morphologie und Konfluenz untersucht. Zuerst wird nun das alte Kulturmedium abgezogen, bevor einmal mit PBS^{-/-} gewaschen wird, um Medienrückstände restlos zu entfernen. Daraufhin werden die Zellen entweder mit 0,05%-iger Trypsin/EDTA-Lösung oder Accutase für etwa 5 min bei 37°C im Brutschrank behandelt, sodass sich die Zellen vom Boden des Zellkulturgefäßes ablösen. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren werden die Zellen vereinzelt. Nun wird der Zellsuspension FCS-haltiges Kulturmedium zugefügt, wodurch der enzymatische Verdau aufgrund der im FCS enthaltenen Inhibitoren abgestoppt wird. Mittels des automatisierten TC20™ Zellzählers von Biorad wird nun die Zellzahl bestimmt und anschließend eine zelllinienspezifische Zellzahl in einem definierten Endvolumen in eine neue Zellkulturflasche ausgesät (5 ml Endvolumen pro T25-Zellkulturflasche; 15 ml Endvolumen pro T75-Zellkulturflasche). Für die Zellzählung am TC20™ werden 10 µl der Zellsuspension, die zuvor gut gemischt wurde, auf einen speziellen Objektträger gegeben. Nach der Aussaat werden die Zellen bis zur weiteren Verarbeitung im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 90% inkubiert.

2.2.1.2. Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Hohe Passagenzahlen erhöhen das Risiko genetischer Entartung. Um diese zu vermeiden und die zelltypischen Merkmale zu erhalten, werden Zellen in niedrigen Passagenzahlen kryokonserviert. Hierzu wird zunächst wie bei einer Zellpassage verfahren. Nach Bestimmung der Zellzahl wird die Zellsuspension bei $107 \times g$ für 10 min bei RT zentrifugiert und daraufhin 2×10^6 Zellen in kaltem Kryomedium resuspendiert. Dieses enthält 30% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO). Nach Überführen der Zellen in ein Kryoröhrchen werden die Zellen sofort auf Eis gestellt und über Nacht bei -80°C gelagert, um das Einfrieren so schonend wie möglich zu gestalten, bevor sie am Tag darauf in den Stickstofftank überführt werden, indem sie in flüssigem Stickstoff auf -196°C heruntergekühlt und gelagert werden.

Beim Auftauen der Zellen ist eine schnelle Inkulturnahme entscheidend, um eine Schädigung durch das zytotoxische DMSO zu verhindern. Hierfür werden die Zellen schonend bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und zunächst in 20 ml kaltem Kulturmedium verdünnt. Nach der Zentrifugation bei $107 \times g$ für 10 min bei 4°C , wodurch das DMSO entfernt wird, wird das Zellepellet in vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und in die Zellkulturflasche überführt. Bevor die Zellen für Versuchszwecke verwendet werden, sollten diese je nach Zelllinie ein bis dreimal passagiert werden.

2.2.1.3 Inhibitorbehandlung

DNA-PK-Inhibition

Die DNA-PKs ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase der Phosphoinositid-3-Kinase- (PI3K) Familie und bildet zusammen mit dem Ku70/Ku80-Komplex das Holoenzym DNA-angängige Proteinkinase (DNA-PK) (Smith und Jackson 1999, Chan, Chen *et al.* 2002). NU7441 ist ein hoch wirksamer und selektiver, ATP-kompetitiver DNA-PK Inhibitor (Leahy, Golding *et al.* 2004, Tavecchio, Munck *et al.* 2012), durch den die Autophosphorylierung an Serin 2056 der katalytischen Untereinheit (*cs = catalytic subunit*) der DNA-PK gehemmt wird (Willmore, Elliott *et al.* 2008). Die Stammlösung wies eine Konzentration von 7,5 mM in DMSO auf, sodass für alle Versuche eine Verdünnung von 1:1000 und dementsprechend nach Biehs, Steinlage *et al.* (2017) eine Endkonzentration von 7,5 μM eingesetzt wurde. Für in dieser Arbeit durchgeführte Experimente nach Röntgenbestrahlung wurde der Inhibitor 6 h bzw. 8 h nach Bestrahlung den Zellen zugeführt und die Anzahl an γH2AX -Foci 10 h nach Bestrahlung bestimmt, um den Einfluss auf die langsame DSB Reparaturkomponente untersuchen zu können. Aufgrund der veränderten DSB-Reparaturkinetik nach Schwerionenbestrahlung wurde der Inhibitor in diesen Experimenten zu einem früheren Zeitpunkt, nämlich 3 h bzw. 4 h nach Bestrahlung, zugegeben. Die Anzahl an γH2AX -Foci wurde ebenfalls 10 h nach Bestrahlung bestimmt.

p97/VCP-Inhibition

NMS-873 ist ein allosterischer p97/VCP Inhibitor (Magnaghi, D'Alessio *et al.* 2013), der in einer Stocklösung von 50 mM in DMSO angesetzt wurde. Die einzusetzende Endkonzentration von 50 μM wurde zunächst anhand der deutlich reduzierten Proteinmodifikation von RPA durch Phosphorylierung nach p97/VCP Inhibition im

Westernblot ermittelt und festgelegt. Die hier durchgeführten Experimente sahen eine einstündige Vorinkubation mit NMS-873 und eine Evaluierung der RPA-Foci 1 h nach der Bestrahlung vor.

Rad51-Inhibition

B02 ist ein Inhibitor der Rad51-Rekombinase. Er inhibiert die Bindung von Rad51 an einzelsträngige DNA-Bereiche (ssDNA) (Huang, Mazina *et al.* 2012, Alagpulinsa, Ayyadevara *et al.* 2014). B02 wurde in einer Endkonzentration von 50 µM verwendet, wobei zuvor eine Stocklösung von 100 mM in DMSO angesetzt wurde. In dieser Arbeit durchgeführte Experimente sahen eine 30-minütige Vorinkubation mit B02 und eine Evaluierung der Reparatur bis zu 24 Stunden nach Bestrahlung vor.

2.2.1.4 Überlebenskurve

Der klassische Klonogenitätstest wurde bereits vor über 60 Jahren etabliert und dient der Untersuchung der Sensitivität von Zellen auf schädigende Agenzien oder ionisierende Strahlung. Der Originalartikel hierzu, indem sowohl die Methode als auch die erste strahlungsabhängige Dosiswirkungskurve nach Röntgen in menschlichen Hela-Zellkulturen veröffentlicht wurde, erschien bereits 1956 (Puck und Marcus 1956). Grundlegend ermöglicht der Kolonieformitätsassay Unterschiede in der Lebens- und Teilungsfähigkeit, das Vermögen einer Einzelzelle eine Kolonie von mindestens 50 Zellen zu bilden, verschieden behandelter Zellen abzuschätzen und ist in der Strahlenforschung weit verbreitet und oft genutzt.

Hierzu wurde zunächst die Zelllinien-spezifische Plattierungseffizienz (PE) bestimmt, die den prozentualen Anteil an koloniebildenden Zellen beschreibt. Dies sind Einzelzellen, die sich öfter als sechsmal teilen und folglich Kolonien von mehr als 50 Zellen bilden können. Für sortierte G1-Phase Hela.s-Fucci-WT- als auch Hela.S-Fucci-RNF138-KO-Zellen belief sich die PE auf etwa 50%.

Um Überlebenskurven von sortierten G1-Phase-Hela.S-Fucci-Zellen anzufertigen, wurden pro Dosis eine T75er-Zellkulturflasche ausgesät, die dann am Tag der Durchführung mit der entsprechenden Dosis bestrahlt wurde. Direkt im Anschluss wurden die Zellen abgelöst und für die Sortierung am S3 *Cell Sorter* vorbereitet. Nun erfolgte die zellzyklusspezifische Sortierung von etwa 3×10^5 G1-Phase-Zellen pro Dosis, dessen genaue Zellzahl (ZZ) pro ml anschließend noch einmal am TC20™ bestimmt wurde. Unter Berücksichtigung des erwartet verminderten Überlebens S_v nach Bestrahlung und der zuvor ermittelten PE konnte nun anhand der Zellzahl pro ml das auszusäende Volumen I [ml] berechnet werden (Formel 7). Diese ergibt sich mit dem Hintergrund, dass sich unabhängig der Bestrahlungsdosis nach Ende einer zwölf-tägigen Inkubationszeit immer etwa 100 Einzelkolonien bilden können. Die Aussaat des nach dieser Formel berechneten Volumens I [ml] erfolgte für jede Dosis in Triplikaten, sprich in jeweils drei T25er-Zellkulturflaschen, in die 5 ml vorgewärmtes Kulturmedium vorgelegt wurde.

$$I \text{ [ml]} = \frac{100}{ZZ/\text{ml} \times S_v \times PE}$$

Formel 7: Definition des auszusäenden Volumens I [ml]

Nach Ende der zwölf-tägigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit wurde das Zellkulturmedium abgezogen, die Zellen für 30 min mit 3x Methylenblau angefärbt, mit Milliporewasser gewaschen und luftgetrocknet. Nun wurde mittels eines Binokulars die Anzahl an gefärbten Kolonien, die mehr als 50 Zellen beinhalten, bestimmt (Abbildung 19).

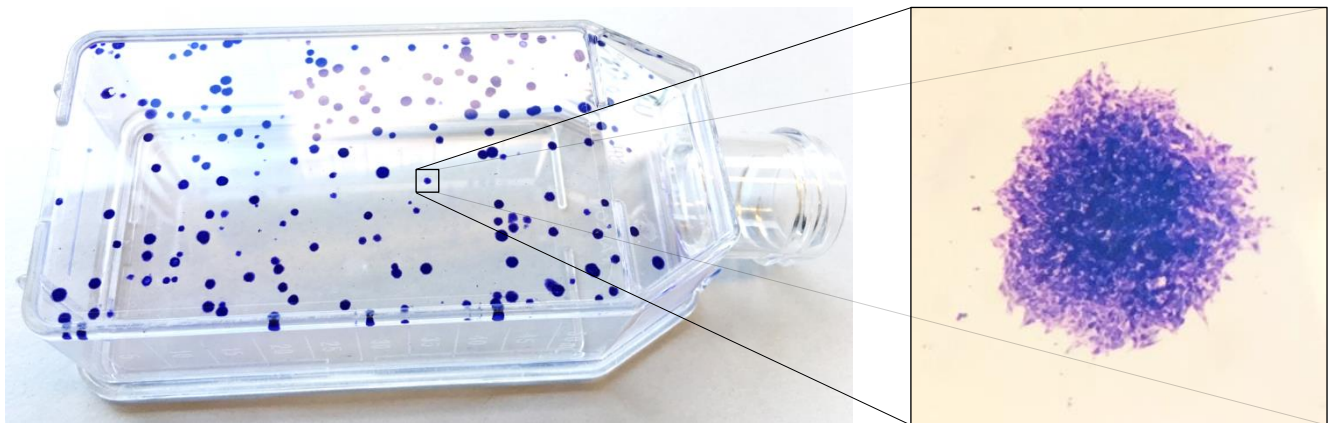


Abbildung 19: Aufnahme gefärbter Kolonien eines Überlebensexperiments. Hela-Fucci-Zellen wurden mit ionisierender Strahlung bestrahlt, sortiert und anschließend spezifisch G1-Phase-Zellen ausgesät. Nach 12-tägiger Inkubation im Brutschrank wurden die Kolonien mit 3x Methylenblau angefärbt.

Nach Formel 8 ließ sich daraus nun das Überleben S berechnen. Dieses entspricht dem Verhältnis der Anzahl der Kolonien zur Zellzahl pro ml und dem ausgesäten Volumen I [ml]. Schlussendlich wurde das Überleben S einer bestrahlten Probe ins Verhältnis zum Überleben der unbestrahlten Probe (0 Gy) gesetzt und so das relative Überleben S_{relativ} ermittelt (Formel 3), das im Fall der unbestrahlten Probe per Definition 100% entspricht.

$$S = \frac{\text{Anzahl gezählter Kolonien}}{\text{ZZ/ml} \times I [\text{ml}]}$$

Formel 8: Definition des Zellüberlebens S .

$$S_{\text{relativ}} = \frac{S_{\text{bestrahlt}}}{S_{\text{unbestrahlt}}}$$

Formel 9: Definition des relativen Überlebens S_{relativ} .

Das Überleben nach niedrig-LET-Bestrahlung wie Röntgenbestrahlung wurde linearquadratisch mit folgender Formel gefittet (Formel 10):

$$Y = \exp(-1 * (A * x + B * x^2))$$

Formel 10: Linearquadratischer Fit zum Fitten von Überlebenskurven mit x = Dosis; A = Koeffizient für den linearen Anteil und B = Koeffizient für den quadratischen Anteil des Zellsterbens.

Nach hoch-LET-Bestrahlung wurde ein linearer Fit angewendet (Formel 11).

$$Y = 10^{(Y_0 + m * x)}$$

Formel 11: Linearer Fit mit Y_0 = Y-Achsenabschnitt und m = Steigung

2.2.2 Vorbereitungen für die Bestrahlung

2.2.2.1 Vorbereitung der alpha-Kammern für die Bestrahlung an der alpha-Quelle

Für die Bestrahlung mit der Alpha-Quelle mussten speziell dafür angefertigte Silberringe mit einer speziell behandelten bio-PET-Folie beklebt werden. Die spezielle Plasma-Behandlung der 2 µm dicken Polypropylenfolie wurde durch einen Kooperationspartner in Halle durchgeführt und erlaubte es Zellen anschließend direkt ohne weitere Behandlung oder Beschichtung darauf auszusäen. Die reaktiven Spezies unter atmosphärischen Druckbedingungen interagieren mit der Oberfläche der Folie und zerstört hauptsächlich C-H (397 kJ/mol) und C-C (370 kJ/mol) Bindungen. Diese werden durch Sauerstoffverbindungen wie Alkohole, Aldehyde, Carbonyle, Ester oder Azide ersetzt. Aufgrund dieser chemischen Modifikation der Oberfläche der Folie wird dessen Polarität erhöht, wodurch die benetzbarkeit mit polaren Flüssigkeiten verbessert wird ohne dabei die Morphologie oder optische Eigenschaften der Folie zu verändern (Dorai und Kushner 2003). Dies erleichterte zum einen die Aussaat der Zellen und zum anderen konnte eine gleichmäßige Bestrahlung der Zellen mit der gewünschten Dosis gewährleistet werden.

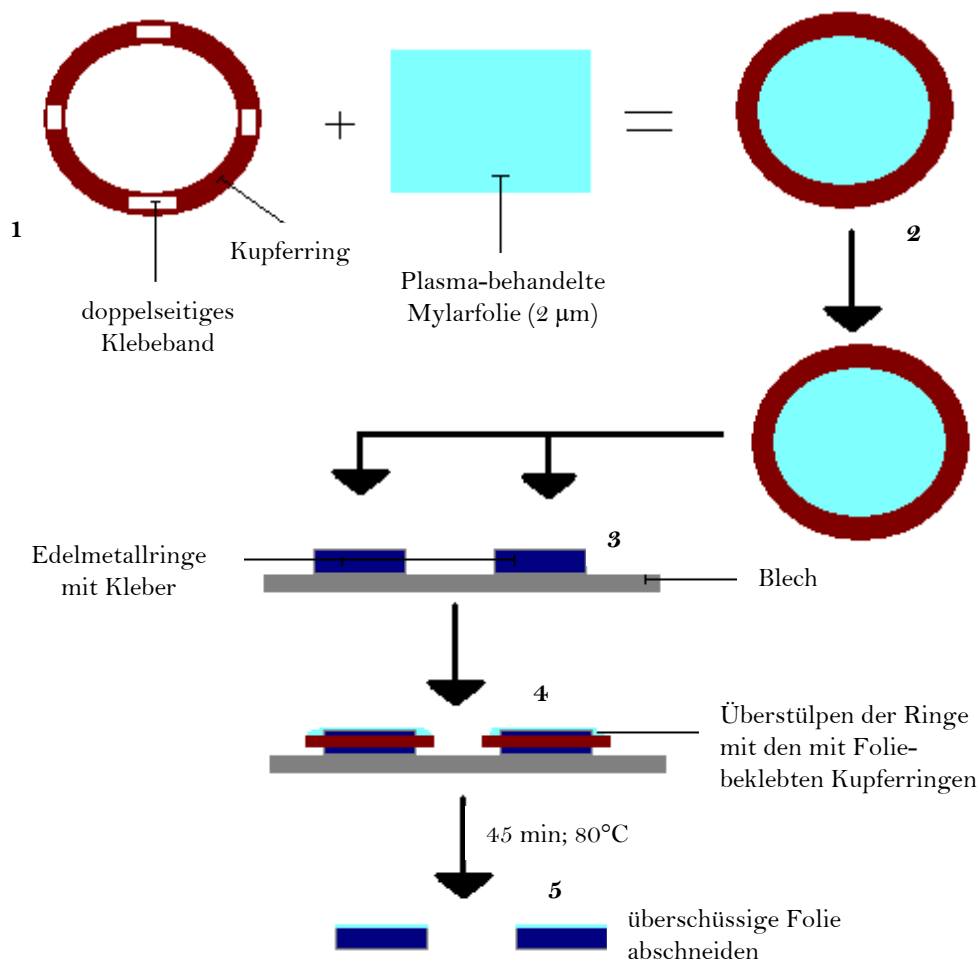


Abbildung 20: Schema der Vorbereitung der Edelmetallringe für die alpha-Teilchen-Bestrahlung. Zunächst werden Kupferringe mit doppelseitigem Klebeband beklebt und auf die speziell für die Zellkultur behandelte Mylarfolie geklebt, wobei sich die behandelte Seite der Folie unten befindet (1). Nun werden die Ränder der Edelmetallringe mit Kleber bestrichen, sodass nun die mit Folie beklebten Kupferringe so über die Edelmetallringe gestülpt werden kann, dass sich die behandelte Seite der Folie im inneren des Rings befindet (2-4). Durch 45-minütiges Backen bei 80°C härtet der Kleber aus. Schlussendlich kann überschüssige Folie mit Hilfe einer Rasierklinge entfernt (5) und die fertigen Kammern autoklaviert werden, sodass die für die Zellkultur steril sind.

Für das Bekleben der Edelmetallringe wurden zunächst auf den Rand eines Kupferrings mehrere Stücke doppelseitiges Klebeband aufgebracht und dann auf die unbehandelte Seite der Mylarfolie geklebt. Nun wurde auf die untere Kante des Edelmetallrings 2-Komponentenkleber (UHU-Endfest 300) aufgetragen und mit der Kleber-behandelten Seite nach oben auf ein Blech gelegt, sodass der Edelmetallring anschließend mit dem Folie beklebten Kupferring überstülpt werden konnte (Abbildung 20). Dabei galt es zu beachten die Kupferringe so auf die Edelmetallringe zu setzen, dass die sich behandelte Seite der Folie, auf welcher die Zellen später wachsen können, innen befindet und dabei nicht beschädigt wurde. Zusätzlich wurden die Kupferringe mit einem weiteren Kupferring beschweret, um die Folie möglichst glatt zu ziehen. Darauffolgend wurden die Ringe für 45 min in den Ofen bei 80°C gelegt, sodass der Kleber aushärten konnte. Waren die Ringe abgekühlt konnte mit einer Rasierklinge die überstehende Folie um den Edelmetallring herum abgeschnitten werden. Vor der Aussaat der Zellen in die Kammern, wurden diese nun noch für 1 h und bei 1 bar bei 121°C autoklaviert und so für die Zellkultur sterilisiert.

2.2.2.2 Vorbereitung der Zellen in Magazinen für die Bestrahlung am Linearbeschleuniger

Die Bestrahlung am Linearbeschleuniger UNILAC (*Universal Linear Accelerator*) erfolgt in 3,5 cm Petrischalen, in die die Zellen entsprechend zuvor ausgesät und eventuell vorbehandelt wurden. Vor der Bestrahlung wurde das konditionierte Medium in einem 50 ml-Falcon gesammelt. Sowohl für den Probentransport als auch die Bestrahlung wurden Magazine aus Plexiglas genutzt (Abbildung 21), die mit Kulturmedium ohne Zusätze gefüllt wurden.

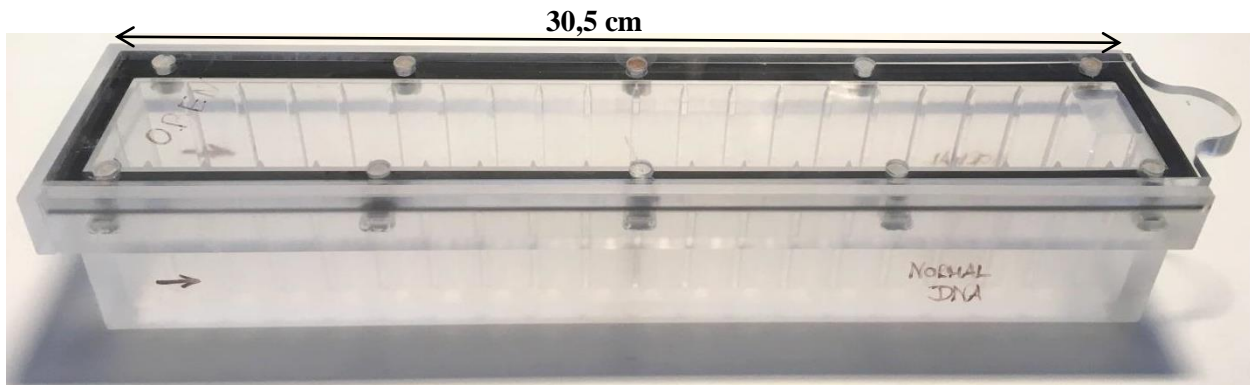


Abbildung 21: Magazin für die Bestrahlung am Linearbeschleuniger UNILAC. Die Bestrahlung am Linearbeschleuniger UNILAC erfolgt in Magazinen aus Plexiglas einer Länge von 30,5 cm, was es ermöglicht 20 Petrischalen eines Durchmessers von 35 mm darin zu platzieren und nacheinander zu bestrahlen. Diese Magazine werden soweit mit Zusatz-freiem Medium befüllt, dass sich der komplette zellbewachsene Boden in der Flüssigkeit befindet, die obere Kante der Petrischale jedoch frei von Flüssigkeit bleibt, um ein sicheres Greifen des Roboterarms zu gewährleisten.

Im Fall der Senkrechtbestrahlung der Zellen, sprich in einem Winkel von 90° zur Adhäsionsfläche, wurden je 20 Petrischalen mit der Zellseite dem Ionenstrahl zugewandt pro Magazin in dieses eingeführt. Ein computergesteuerter Roboterarm mit Saugnapf diente dazu, die Petrischalen nacheinander aus dem Magazin zu heben und so einzeln mit einer zuvor eingestellten Dosis zu bestrahlen. Im Zuge der Bestrahlung waren die Zellen dabei für einige Sekunden in der Luft und lediglich durch einen dünnen Film an restlichem Medium bedeckt, bevor sie zurück in das mit Medium gefüllte Magazin zurückgesetzt wurden, um sie vor Austrocknung

zu schützen. Bei dieser Bestrahlung war zu beachten, dass sich am unteren Rand der Petrischale etwas Medium ansammelt, wodurch die Zellen in diesem Bereich nicht bestrahlt und vorrangig bei Überlebenskurven durch vorsichtiges Entfernen der Zellen an dieser Stelle mittels eines Wattestäbchens abgetragen werden mussten, sodass ausschließlich bestrahlte Zellen weiterverwendet wurden. Nach der Bestrahlung aller Petrischalen eines Magazins wurden die Proben wieder aus dem Magazin entnommen, mit dem zuvor aufbewahrten, konditioniertem Medium bedeckt und für die gewünschte Dauer im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.2.2.3 Vorbereitung der Zellen in Magazinen für die Bestrahlung am SIS

Für die Schrägbestrahlung am Schwerionensynchrotron SIS wurden die Zellen ebenfalls in 3,5 cm Petrischalen ausgesät und eventuell vorbehandelt. Die Bestrahlung erfolgte in T25er Zellkulturflaschen, deren obere Wand entfernt und Petrischalen hineingestellt wurden (Abbildung 22). Eine Zellkulturflasche fasste je vier Petrischalen, zwei unten und zwei oben, getrennt durch einen Objektträger. Je zwei Zellkulturflaschen übereinander gestapelt mit je vier Petrischalen darin wurden für die Bestrahlung so auf das Band gestellt, sodass der Ionenstrahl in einem flachen Winkel auf die Zellen traf. Nach der Bestrahlung wurden die Proben für die gewünschte Dauer im Brutschrank bei 37°C inkubiert und anschließend fixiert.

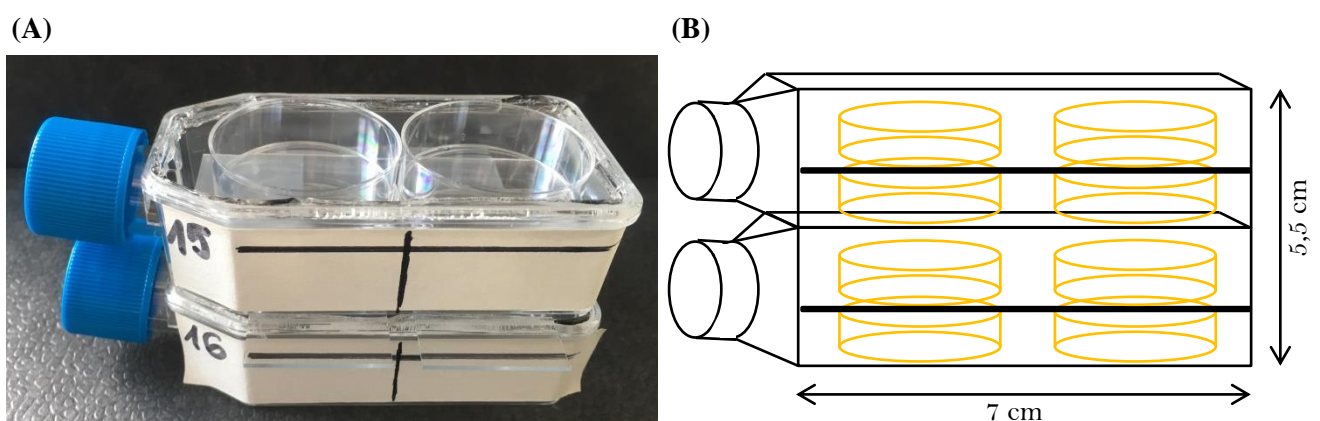


Abbildung 22: Foto (A) und schematische Darstellung (B) des Aufbaus für die Schrägbestrahlung am SIS. Eine T25er Zellkulturflasche, deren Deckel für die Schrägbestrahlung am SIS entfernt wurde, um Petrischalen hineinsetzen zu können, fasst vier Petrischalen, je zwei übereinander durch einen Objektträger getrennt. Für die Bestrahlung können dann wiederum zwei T25er Zellkulturflaschen übereinandergestapelt und gemeinsam bestrahlt werden.

2.2.3 Bestrahlung der Zellen

2.2.3.1 Röntgenbestrahlung

Bei der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen wird die Dosis gleichmäßig über den gesamten Nukleus deponiert, wodurch unter anderem auch DNA-Schäden wie DNA-Doppelstrangbrüche erzeugt werden können. In der evakuierten Röntgenröhre befinden sich eine Kathode, an der eine Heizspannung angelegt ist, sowie eine Anode. Durch thermische Emission entstandene Elektronen werden durch das Potential zwischen Kathode und Anode zur Anode hin beschleunigt. Die hierbei entstehende Energie wird zum größten Teil als Wärme freigesetzt, weshalb das Anodenmaterial gekühlt werden muss. Die restliche Energie wird in Röntgenstrahlung

umgewandelt, welche aus der vom Anodenmaterial abhängigen charakteristischen Strahlung und der kontinuierlichen Bremsstrahlung besteht. Über ein Beryllium-Fenster kann die Röntgenstrahlung aus der ansonsten komplett abgeschirmten Röntgenröhre austreten und in einem definierten Bereich unterhalb des Fensters zur Bestrahlung von Proben genutzt werden (Abbildung 23).

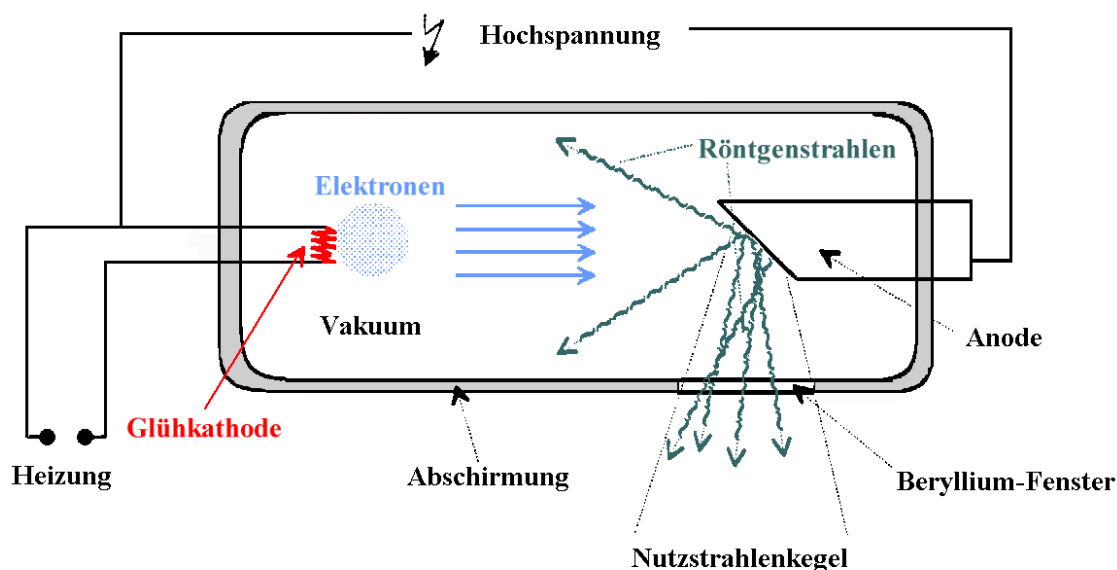


Abbildung 23: Schema einer Röntgenröhre. Durch thermische Energie werden Elektronen erzeugt, die zur Anode hin beschleunigt werden und dort ihre Energie in Form von Wärme und Röntgenstrahlung abgeben. Diese kann über ein Fenster aus der ansonsten abgeschirmten Röntgenröhre austreten und somit zur Bestrahlung von Proben genutzt werden (nach Stahlenbiologie MTB7 WS1415).

In diesem Fall erfolgte die Röntgenbestrahlung an der Röntgenröhre ISOVOLT 320 M1 der Firma Seifert/GE bei einem Kathodenstrom von 16 mA und einer Beschleunigungsspannung von 250 kV. Mit Hilfe eines SN4 Dosimeters (PTW, Freiburg, Deutschland) wurde die Dosisrate gemessen und kontrolliert. Die Kalibrierung erfolgte nach Fricke. Im Verlauf der Bestrahlung verblieben die Zellen die ganze Zeit über in ihrem Kulturmedium. Neben den bestrahlten Proben wurden zudem immer unbestrahlte Kontrollproben mitgeführt, die demselben Stress ausgesetzt waren wie die bestrahlten Proben.

2.2.3.2 Alpha-Teilchen-Bestrahlung

Die hier verwendete Alpha-Quelle ist eine Americium-Quelle (^{241}Am) der Firma Eckert & Ziegler (Abbildung 24A). ^{241}Am hat eine Halbwertszeit von etwa 432,6 Jahren, zerfällt fast komplett durch α -Zerfall zunächst zu ^{237}Np und endet zumeist beim stabilen ^{205}Tl . Die verwendete Quelle hat einer Aktivität von 25 MBq, ist 10 mm hoch und besitzt einen Durchmesser von 40 mm. Durch den speziell an der GSI entwickelten Aufbau wird der Luft-Abstand zwischen Quelle und Probe auf 2,7 mm minimiert (Abbildung 24B) (Maier, Wiedemann *et al.* 2019).

Die Klappe (*Shutter*), welche im geschlossenen Zustand die komplette Quelle abdeckt, hat eine Öffnung von 35 mm Durchmesser, sodass die speziell angefertigten Alpha-Kammern genau hineinpassen. Der LET der Alpha-Teilchen beträgt etwa 150 keV/ μm und die Dosisrate bei der hier verwendeten 2 μm dicken Mylarfolie und einer Zellkerndicke von etwa 5 μm $8,8 \pm 2,4$ Gy/min, sodass die Bestrahlungszeit pro Gy 6,9 Sekunden betrug (Maier, Wiedemann *et al.* 2019).

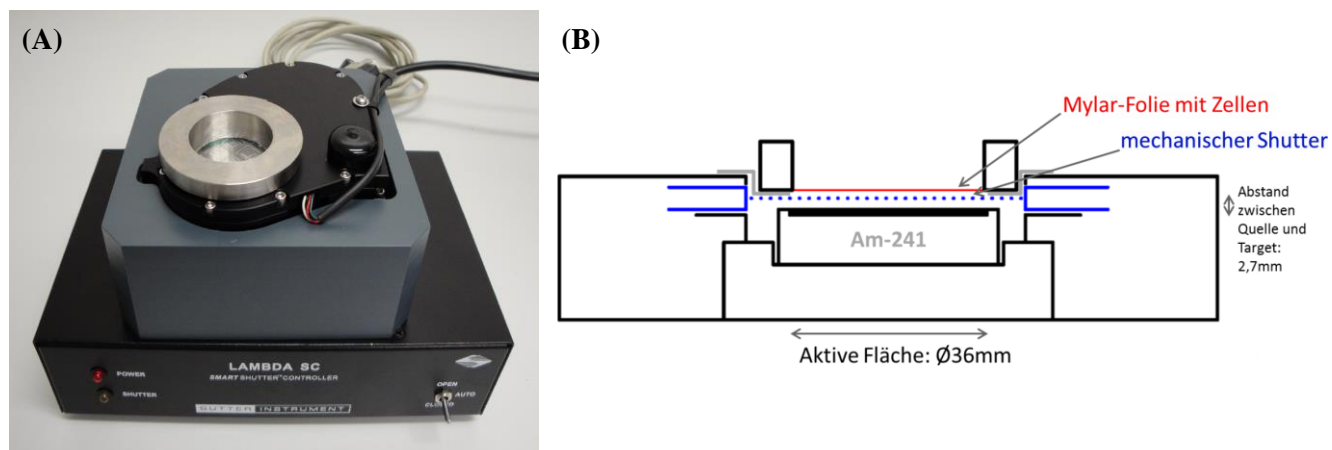


Abbildung 24: Foto (A) und schematische Darstellung (B) der alpha-Teilchen-Bestrahlungsapparatur (nach der Bachelorthesis von Andreas Zipf). Über der Kontrolleinheit befinden sich die ^{241}Am -Quelle, der mechanische Shutter (im Schema blau dargestellt) und ein alpha-Bestrahlungsring mit plasmabehandelter bio-PET-Folie beklebt, auf dem die zu bestrahlenden Zellen wachsen (im Schema rot dargestellt).

2.2.3.3 Schwerionenbestrahlung am Linearbeschleuniger UNILAC

Am Linearbeschleuniger, dem UNILAC (*Universal Linear Accelerator*) erfolgte die Bestrahlung mit Kohlenstoff- (^{12}C) sowie Eisenionen (^{56}Fe). Eigenschaften der verschiedenen Strahlenarten wie LET, Primärenergien und Fluenzen sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Charakteristika der verwendeten Ionen am Linearbeschleuniger UNILAC

Ion	LET [keV/ μm]	Primär- energie [MeV/u]	Energie auf Zielobjekt [MeV/u]	Fluenz [Teilchen/ cm^2] 1 Gy	verwendete Fluenzen [Teilchen/ cm^2]	Dosis [Gy]
Eisen (^{56}Fe)	2875	11,4	7,0	$2,17 \times 10^5$	5×10^6	$\sim 23,0$
Kohlenstoff (^{12}C)	168	11,4	9,9	$3,72 \times 10^6$	$1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$	0,5 – 3,0
Kohlenstoff (^{12}C)	325	6,5	3,9	$1,87 \times 10^6$	5×10^6	$\sim 2,7$

Je nach Experiment wurden die Zellen senkrecht in einem Winkel von 90° zu ihrer Anheftungsfläche (Abbildung 25A) oder schräg in einem Winkel von etwa 4° zu ihrer Adhäsionsfläche bestrahlt (Abbildung 25B). Im Fall der Schrägbestrahlung kann die Proteinrekrutierung und –akkumulation entlang des Ionenstrahls analysiert werden, wohingegen bei der Senkrechtbestrahlung die Rekrutierung als Signalfokus (Focus) sichtbar gemacht werden kann (Jakob, Scholz *et al.* 2003).

Für die Schrägbestrahlung am Linearbeschleuniger UNILAC wurden die Zellen auf $24 \times 24 \text{ mm}$ Deckgläschen ausgesät, denen zuvor zwei Ecken an einer Seite abgetrennt wurden. Diese Deckgläschen wurden nun mit den abgetrennten Ecken zuerst und der mit Zellen bewachsenen Seite nach unten in eine spezielle Halterung eingeführt (Abbildung 26), in denen sie anschließend in ein Magazin für die Bestrahlung am UNILAC eingesetzt wurden. So befanden sich die Zellen in einem Winkel von etwa 4° zum Ionenstrahl und konnten somit schräg zu ihrer Anheftungsfläche bestrahlt werden.

(A) Senkrechtbestrahlung (B) Schrägbestrahlung

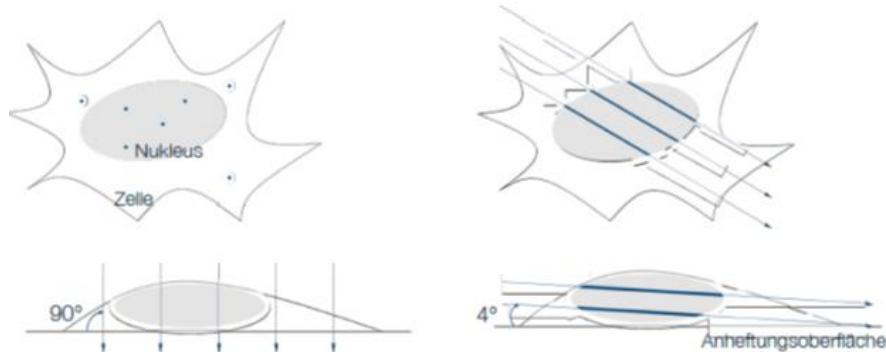


Abbildung 25: Schema der Senkrecht- (A) und Schrägbestrahlung (B) mit Schwerionen. Gezeigt ist jeweils eine Auf- und Seitenansicht senkrecht bzw. schräg bestrahlter Zellen. Die Pfeile deuten hierbei die jeweilige Durchtrittsrichtung der Ionen durch die Zelle an. Im Fall der Senkrechtbestrahlung können die DNA-Schäden in Form von Foci beobachtet werden. Bei der Schrägbestrahlung hingegen können die Schäden als Signalspur durch den Nukleus sichtbar gemacht werden.

Aufgrund der vergleichsweise niedrigen Energie, mit der am UNILAC bestrahlt wird, dringen die Ionen weder durch das Deckglas noch durch dickere Flüssigkeitsfilme, wodurch nur in einem bestimmten Bereich am Rand des Deckglases nahezu alle Zellen bestrahlt wurden (Abbildung 25). Die Anzahl der getroffenen Zellen zum Deckglasinneren hin hingegen nimmt immer weiter ab und unten, wo sich die meiste Flüssigkeit während der Bestrahlung ansammelt, liegen quasi unbestrahlte Bereiche vor. Daher findet die mikroskopische Auswertung vorrangig in diesen mit Sicherheit komplett homogen bestrahlten Bereichen auf dem Deckglas statt, wobei der untere Teil des Deckglases als unbestrahlte Kontrolle genutzt werden kann.

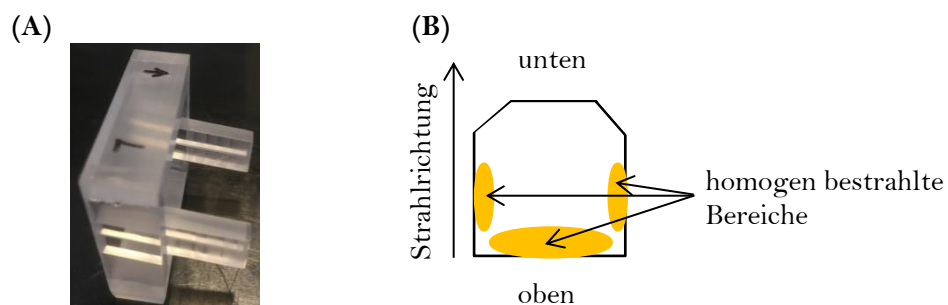


Abbildung 26: Halterung für die Schrägbestrahlung am UNILAC. Für die Schrägbestrahlung der Zellen in einem Winkel von etwa 4° zur Adhäsionsfläche am Linearbeschleuniger UNILAC wurden die Zellen auf 24 x 24 mm großen Deckgläschen ausgesät. Diese wurden dann in eine spezielle Halterung (A) eingeführt, welche die Bestrahlung in diesem schrägen Winkel erlaubt. Aufgrund der niedrigen Energie mit der am UNILAC bestrahlt wird, ergeben sich am Rand des Deckglases Bereiche, in denen nahezu alle Zellen homogen bestrahlt werden (B), wohingegen die Anzahl der bestrahlten Zellen, aufgrund der sich dort ansammelnden Flüssigkeit, nach innen hin abnimmt.

2.2.3.4 Schwerionenbestrahlung am Synchrotron SIS 18

Am Schwerionensynchrotron SIS 18 erfolgte die Bestrahlung mit Eisenionen (^{26}Fe). Eigenschaften wie LET, Primärenergie, Fluenz und Dosis sind Tabelle 2 zu entnehmen. Je nach Experiment wurden die Zellen senkrecht

in einem Winkel von 90° zu ihrer Anheftungsfläche in 3,5 cm Petrischalen in speziellen SIS-Magazinen oder schräg in einem Winkel von etwa 4° zu ihrer Adhäsionsfläche bestrahlt. Im Fall der Schrägbestrahlung wurden Petrischalen übereinander in eine leere Zellkulturflasche und während der Bestrahlung leicht schräg gestellt, sodass die Proteinrekrutierung und –akkumulation entlang des Ionenstrahls analysiert werden konnte. Des Weiteren konnten am SIS sowohl T25er als auch T75er Zellkulturflaschen bestrahlt werden. Diese wurden für die Dauer der Bestrahlung kurz über einen speziell angefertigten Roboter aufgestellt, sodass sich die Flaschen in vertikaler Position befanden, bevor sie nach der Bestrahlung direkt wieder abgesetzt und horizontal gelagert wurden, sodass die Zellen optimal mit Medium versorgt waren. Bei längerer Bestrahlungsdauer wurden die Zellkulturflaschen komplett mit Medium gefüllt und direkt hochkant aufs Band gestellt, um ein Austrocknen der Zellen während der Zeit der Bestrahlung zu verhindern.

Tabelle 2: Charakteristika der verwendeten Eisenionen am Schwerionensynchrotron SIS 18

Ion	LET [keV/μm]	Primär- energie [GeV/u]	Fluenz [Teilchen/ cm ²] 1 Gy	verwendete Fluenzen [Teilchen/ cm ²]	Dosis [Gy]
Eisen (⁵⁶ Fe)	155	1	4 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁶ - 1,2 x 10 ⁸	0,5 – 30,0

2.2.3.5 Laserbestrahlung

Für die Laserbestrahlung wurde das Lasermikrodissektionssystem DM LA mit entsprechender Software von Leica und einem MNL 100 Stickstofflaser von LTB verwendet. Der Mini Nitrogen Laser (MNL 100) ist ein UV-Gaslaser mit einer Wellenlänge von 337,1 nm und einer Pulsenergie von bis zu 225 μJ. Mittels Präzisionsoptik über Prismen wird der Laser über die Probe gelenkt und erlaubt es so senkrecht zur Probe zu lasern. Hierzu wird ein spezielles 10 x LMD Objektiv verwendet. Über die Lasermikrodissektionssoftware kann der Laser gelenkt und gezielt mehrere Laserstreifen pro Bildfeld gesetzt werden. Um die zu lasernden Zellen besser ausmachen und gezielt lasern zu können, wurden die Zellkerne zuvor für 30 min mit 0,5 μM Hoechst 33342 angefärbt und sensitiviert (siehe Kapitel 2.2.4.1). Anhand der Zellkern-Hoechst-Färbung war es zudem möglich die Laserbestrahlung direkt zu verfolgen, da gelaserte Bereiche gebleicht werden. Die Laserbestrahlung erfolgte bei 337 nm mit einer Intensität von 9, das etwa 1 μW entspricht, und einer Geschwindigkeit von 7. Um den Zellen über den Zeitraum der Bestrahlung möglichst optimale Bedingungen zu liefern, wurden die Zellen auf 40 mm Deckgläschen ausgesät, welche dann für die Laserbestrahlung in eine spezielle Halterung eingebracht wurden. Diese ermöglicht es den dünnen Film an Medium, der sich zwischen dem Deckglas mit den Zellen und einem weiteren speziellen Deckglas mit Kontakten für das Heizsystem befindet, auf die gewünschte Temperatur von 37°C zu erwärmen. Im Fall der CtIP-Rekrutierung nach Laserbestrahlung wurde die Bestrahlungsdauer auf 30 min angesetzt, sodass die Proben anschließend weitere 30 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert, daraufhin fixiert und dementsprechend Rekrutierungszeitpunkte zwischen 30 und 60 min analysiert werden konnten. Im Gegensatz zur CtIP-Rekrutierung, welche zwischen 30 und 60 min erwartet wurde, war die RNF138-Rekrutierung nach Laserbestrahlung zu sehr kurzen Zeiten nach Bestrahlung erwartet worden. Daher wurden die gelaserten Zellen in diesem Fall direkt nach der Bestrahlung live über die Kamera beobachtet und die Rekrutierung über die Kamera und AndorIQ Software in verschiedenen Zeitabständen dokumentiert.

2.2.4 Immunzytochemische Methoden

2.2.4.1 Lebendzellfärbung mit Hoechst

Um lebende Zellen anzufärben und deren Zellkerne sichtbar zu machen, wurde vor Versuchsbeginn Hoechst 33342 in einer Konzentration von 0,5 μM für 30 min dem Kulturmedium zugegeben und im Brutschrank inkubiert. Die Anregungswellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffs Hoechst liegt bei etwa 340 nm im UV-Licht Bereich. Emittiert wird Licht im Spektrum von blau bis cyan bei etwa 510 nm, wobei das Emissionsmaximum des DNA-gebundenen Farbstoffs bei ca. 465 nm liegt. Hoechst wirkt nur sehr gering und kurzfristig toxisch, weshalb sich der Farbstoff gut für Lebendzellexperimente eignet.

2.2.4.2 Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA)

Zunächst wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS^{-/-} gewaschen. Nun erfolgte die Fixierung der Zellen mit einer 2%-igen PFA-Lösung in PBS^{-/-} für 15 min. Anschließend wurden die Zellen dreimal für 5 min mit PBS^{-/-} gewaschen und im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Bei längeren Lagerdauern wurden die Proben in PBS^{-/-} +0,02% Natrium-Azid aufbewahrt, um Kontaminationen vorzubeugen.

2.2.4.3 EdU-Markierung replizierender Zellen und EdU-Click-Reaktion

Zur Detektion der Zellproliferation bzw. Zuordnung von Zellen innerhalb des Zellzyklus stellt der Assay von Roth mit EdU (5-Ethynyl-2'-desoxyuridin) eine einfache Möglichkeit dar, indem DNA-Synthese direkt gemessen wird. Somit kann das Verhalten von Zellen in Abhängigkeit des Zellzyklus untersucht werden. Hierbei wird das Thymidin-Analogon EdU während der DNA-Synthese- (S-)Phase in proliferierenden Zellen eingebaut und später nachgewiesen (Salic und Mitchison 2008, Kotogany, Dudits *et al.* 2010). Der Nachweis erfolgt nicht unter Verwendung von Antikörpern, die das eingebaute Nukleotid erkennen, sondern über die sogenannte Click-Chemie für den Nachweis verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, wie 6-FAM-Azide (grün), 5/6-Sulforhodamine 101-PEG3-Azide (orange) oder Eterneon Red 645-Azide (rot). Zunächst werden Zellen mit 10 μM EdU, das direkt dem Kulturmedium zugegeben wird, markiert. Folglich werden alle Zellen, die sich in der S-Phase befinden oder aber diese während des EdU-Pulses passieren, markiert. In den hier durchgeführten Experimenten wurde direkt nach der Bestrahlung EdU dem Kulturmedium zugesetzt und die Zellen bis zur Fixierung mit EdU behandelt. Dies ermöglicht es später Zellen auszuschließen, die sonst fälschlicherweise als Zellen analysiert worden wären, die in G2 bestrahlt wurden, obwohl sie tatsächlich in G1 oder S bestrahlt wurden. Durch die EdU-Markierung werden Zellen, die sich während der Bestrahlung in der G1- oder S-Phase befanden, im Laufe der Inkubation nach Bestrahlung jedoch durch die S-Phase weiter in die G2-Phase wandern, EdU-positiv und können so bei der späteren Analyse der G2-Phasen ausgeschlossen werden. Der EdU-Nachweis erfolgt über eine sogenannte Click-Reaktion, bei der ein Azid, der Fluoreszenzfarbstoff, in einer Kupfer-katalysierten Reaktion kovalent an ein Alkin, das in die DNA-ingebaute EdU, gebunden wird (Wang, Chan *et al.* 2003). Da diese Click-Reaktion nicht auf Antikörpern beruht, besteht keinerlei Einschränkung bei einer zusätzlichen Immunfärbung. Zudem benötigt man bei der EdU-Click-Reaktion keine Denaturierung, die für die Detektion von beispielsweise γH2AX -Foci hinderlich wäre. Für die Kombination der EdU-Click-Reaktion mit einer anderen Immunfärbung wurden die Zellen zunächst für 10 min mit 0,5%-iger Triton-X-100

Lösung in PBS^{-/-} permeabilisiert, anschließend die Click-Reaktion durchgeführt, bevor die Immunfärbung angeschlossen wurde. Für die Click-Reaktion wurden die in Tabelle 3 beschriebenen Lösungen, welche alle im Carl Roth's ROTI®kit für Imaging (EdU Click-594)“ enthalten sind, in den ebenfalls in Tabelle 3 aufgeführten Mengen der Reihe nach frisch vor Gebraucht in einem Eppendorfgefäß gemischt. Nun wurden je 200 µl Reaktionsgemisch pro Deckglas für 30 min auf die Zellen gegeben und im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem waschen mit PBS-T erfolgte die Immun- und Kernfärbung wie in Kapitel 2.2.4.4 und 2.2.4.6 beschrieben.

Tabelle 3: Lösungen und Mengen des EdU-Click-Reaktionscocktails. Die in dieser Tabelle aufgeführten Lösungen wurden in den angegebenen Mengen der Reihenfolge nach gemischt und auf die zu färbenden Zellen gegeben.

Komponente	Röhrchen-Farbe im Kit	Volumen pro Deckglas [µl]
Millipore-H ₂ O, steril	-	151,6
Reaktionspuffer (10x)	orange	20
Katalysatorlösung	grün	8
Fluoreszenzfarbstoff (10 mM) (6-FAM-Azide, 5/6-Sulforhodamine 101-PEG3- Azide oder Eterneon Red 645- Azide)	rot	0,4
Pufferzusatz (10x)	blau	20
Gesamtvolumen		200

2.2.4.4 Immunfluoreszenzfärbung

Zum immunhistochemischen Nachweis von Proteinen wird das Antigen zunächst über einen primären Antikörper markiert, welcher daraufhin durch Bindung eines spezifischen, Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper detektierbar gemacht werden kann. Der primäre Antikörper wird zuerst entsprechend (siehe Kapitel 2.1.7) in 0,1% Triton-X-100 in PBS^{-/-} verdünnt und auf die zu färbenden Zellen gegeben. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgt für 90 min bei RT oder alternativ über Nacht im Kühlschrank bei 4°C. Mit Millipore getränkte Tücher, welche neben den Proben platziert wurden, verhinderten ein Austrocknen der Proben während der Inkubationszeit. Nach dreimaligem Waschen mit PBS^{-/-} + 0,1% Tween 20, um Rückstände des Erstantikörpers zu entfernen, wurde der entsprechend in 3% BSA + 0,1% Triton-X-100 in PBS^{-/-} verdünnte Zweitantikörper (siehe Kapitel 2.1.8) auf die Zellen pipettiert und für 60 min im Dunkeln inkubiert. Nun wurde erneut mit 0,1% Tween 20 in PBS^{-/-} gewaschen, um Reste des Sekundärantikörpers zu entfernen, bevor die Zellkerne mittels DAPI gegengefärbt wurden (vgl. Kapitel 2.2.4.6). Abschließend wurden die Proben einmal kurz in Millipore getunkt, um Salzzrückstände zu entfernen und daraufhin mit SlowFade

eingedeckt. Die Fixierung mit Nagellack diente dem Schutz vor Austrocknung. Bis zur Auswertung am konfokalen Fluoreszenzmikroskop wurden die Proben lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

2.2.4.5 Ku80-Immunfluoreszenzfärbung

Um Ku80 mittels Immunfluoreszenz sichtbar zu machen wurde das von (Britton, Coates *et al.* 2013) beschriebene Protokoll leicht optimiert (Britton, Coates *et al.* 2013). Nach Bestrahlung der Zellen wurden diese zweimal mit PBS^{-/-} gewaschen. Anschließend erfolgte die Vorextraktion mit CSK+R-Puffer dreimal für drei Minuten bei RT (vgl. Kapitel 2.1.4). Darauffolgend wurden die Zellen erneut dreimal für eine Minute mit PBS^{-/-} gewaschen und für 15 min mit 4% PFA fixiert und abermals dreimal für eine Minute mit PBS^{-/-} gewaschen. Nach erfolgter zehnminütiger Permeabilisierung mit 0,2% Triton-X-100 in PBS^{-/-} und erneutem zweimaligem Waschen mit PBS^{-/-} für drei Minuten wurden die Zellen in 5% BSA in 0,05% Tween 20 in PBS^{-/-} (Blocklösung) für eine Stunde geblockt. Die darauffolgende Färbung mit den beiden Primärantikörpern Ku80 (1:100; anti-Ku80 (111) MA5-12933; Maus monoklonal von Thermo Scientific) und 53BP1 (1:500; anti-53BP1 (Ab-1) (PC712); Kaninchen polyklonal von Calbiochem/Oncogene) erfolgte in der zuvor beschriebenen Blocklösung über Nacht bei 4°C im Kühlschrank. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal für fünf Minuten mit PBS^{-/-} gewaschen und anschließend mit den entsprechenden Sekundärantikörpern 1:400 in Blocklösung für fünf Stunden bei RT gefärbt. Nach erneutem dreimaligem Waschen für fünf Minuten mit PBS^{-/-} erfolgte die Nachfixierung mit 2% PFA für zehn Minuten. Nun wurde wiederum zweimal für fünf Minuten mit PBS^{-/-} gewaschen bevor die Zellkerne für zehn Minuten mit DAPI gegengefärbt wurden (vgl. Kapitel 2.2.4.6). Abschließend wurden alle Proben mit SlowFade eingedeckt und zeitnah mikroskopiert.

2.2.4.6 Kernfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

Die Kernfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) eignet sich zum Anfärben von Zellkernen, da er sich an AT-reiche Regionen der DNA anlagert. Dazu wird eine DAPI-Lösung von 1 µg/ml in PBS^{-/-} auf die zu färbenden Zellen gegeben und für sieben Minuten inkubiert. Das Eindecken mit SlowFade erfolgt nach Entfernung eventueller Salzzurückstände durch kurzes Schwenken in Millipore-Wasser. Das Absorptionsmaximum von DAPI liegt im UV-Bereich bei 258 nm und das Emissionsmaximum im kurzwelligen Bereich des sichtbaren Lichts bei 461 nm (blau).

2.2.5 Mikroskopie

2.2.5.1 Immunfluoreszenzmikroskopie

Je nach Verfügbarkeit wurden die Auswertungen und Aufnahmen der Immunfluoreszenzproben an unterschiedlichen Mikroskopen durchgeführt.

Einerseits wurde das konfokale Laser Scanning Mikroskop TCS SPE der Firma Leica verwendet, welches unter anderem mit einem 63x und 100x Objektiv (Ölimmersion) sowie einem Argon-Krypton-Laser, der die Wellenlängen 405 nm, 488 nm, 561 nm als auch 647 nm anregen kann, ausgestattet ist. Somit war es möglich bis zu vier Färbungen gleichzeitig aufzunehmen. Um zu verhindern, dass sich das Fluoreszenzsignal in der Sättigung befindet wurden Laserintensitäten, Signalverstärkung des Photomultiplers sowie der Offset und die

untere Detektionsschwelle immer entsprechend angepasst. Des Weiteren wurden mehrere Aufnahmen der Zellen in der Tiefe in Schritten von etwa 0,25 μm aufgenommen und schlussendlich in dieser Arbeit als Überlagerungen der Maximumprojektionen dargestellt. Für die zum Teil durchgeführte Dekonvolution der erstellten Bilder wurde die Software Huygens Essential verwendet, wohingegen die Bearbeitung der Bilddateien mittels der Software ImageJ durchgeführt wurde.

Alternativ wurde das konfokale Laser-Spinning-Disk-Mikroskop von Nikon (Eclipse Ti mit Spinning Disk Einheit von Yokogawa und EMCCD Kamera von Andor) eingesetzt. Die Anregungswellen des Lasers liegen hier bei 406 nm, 488 nm, 561 nm sowie 640 nm, wodurch ebenfalls bis zu vier Kanäle gleichzeitig aufgenommen werden konnten. Die meisten Aufnahmen wurden hier ebenfalls mit einem 63x oder 100x Objektiv (Ölimmersion) durchgeführt. Auch hier wurden Laserintensitäten, Verstärkung der Kamera wie auch die Integrationszeit entsprechend angepasst und mehrere Aufnahmen im Abstand von etwa 0,20 - 0,25 μm gemacht, um am Ende Maximumprojektionen erstellen und alle Signale in den verschiedenen Tiefen der Zelle erfassen zu können.

2.2.5.2 MetaCyte

Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung DAPI-gefärbter Proben oder zum Teil auch zur Auswertung von γH2AX -Foci, wie in beispielsweise Reparaturkinetiken, wurde das Axio Imager Z2 Fluoreszenzmikroskop von Carl Zeiss und die voll automatisierte Bildaufnahme- und Bildanalysesoftware Metafer 4 von MetaSystems verwendet. Mit Hilfe der MetaCyte Software von MetaSystems lassen sich Zellkerne identifizieren und deren Intensität nach Zellkernfärbung mittels beispielsweise DAPI bestimmen. Hierzu wird ein sogenannter *Pre-Scan* mittels 10x Objektiv von 10.000 Zellen durchgeführt. Wurden die Zellen EdU-Click gefärbt, wurde dieses Signal neben dem DAPI-Signal ebenfalls im *Pre-Scan* erfasst. Anschließend konnten die gescannten Zellen anhand des Histogramms oder des Scatterplots der Intensität der DAPI-Färbung, welche auf den DNA-Gehalt und somit die Zellzyklusphase schließen lässt, und des EdU-Signals, das Zellen der S-Phase oder jene, die während der Inkubationszeit die S-Phase durchliefen, markiert, in verschiedene Populationen unterteilt werden. Der *Pre-Scan* vermittelt zudem einen Eindruck der Zelldichte und Unterschiede in der Konfluenz sowie eventuelle Schädigungen der Zellschicht. Für den *Pre-Scan* wurde der *Classifier* speziell für die Auswertung von U2OS-Zellen optimiert. In diesem wurde unter anderem die minimale und maximale Fläche des Objekts, sprich der Zellkerne, sowie der minimale Abstand zwischen zwei Zellen festgelegt und auf die Zellkerngröße der Osteosarkomzellen angepasst. Nach Einteilung der Zellpopulationen entsprechend des Zellzyklus erfolgte die automatisierte Erfassung der vorselektierten Zellkerne und deren automatische γH2AX -Foci-Zählung. Hierfür wurde das 63er Objektiv mit Ölimmersion verwendet und die im *Pre-Scan* erfassten Zellkerne der entsprechenden Zellpopulation erneut gescannt. Für jeden Zellkern wurden 10 Z-Ebenen im Abstand von 0,20 μm analysiert und die Foci entsprechend in einem weiteren *Classifier* festgelegten Parameter gezählt. Dieser enthält unter anderem Parameter wie die maximale Belichtungszeit, den Sättigungsbereich, Zeiten zwischen Filterwechsel oder Fokusbewegungen, Algorithmen für den unteren und oberen Grenzwert (*threshold*) und die maximale Anzahl an Zellen, die aufgenommen und analysiert werden sollen. Zudem wurden die Foci auf zweierlei Basis ermittelt, nämlich zum einen Spot-basiert (*spot-based*) und zum anderen Objekt-basiert (*object-*

based). Dies wurde so gewählt, da sich ersterer Evaluationsalgorithmus aufgrund speziell angepasster Parameter besser für bestrahlte Proben erwies, wohingegen die Objekt-basierte Auswertung für die Analyse von nicht-bestrahlten Kontrollen genutzt wurde. Anschließend wurden die je 200 dokumentierten Zellkerne pro Probe in der Galerie geprüft und „schlechte“ Aufnahmen wie unscharfe, unvollständige oder Aufnahmen von mehreren Zellkernen aussortiert und schlussendlich die Daten konvertiert und exportiert.

2.2.6 Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 SiRNA-Transfektion mittels HiPerFect

Mittels der RNA-Interferenz ist es möglich die Genexpression einzelner Gene spezifisch vorübergehend auszuschalten. *Small interfering RNA's* (siRNA) sind kleine RNA-Moleküle, die komplementär zu einem Teil der mRNA des zu unterdrückenden Gens sind. Diese kurzen Ribonukleinsäuremoleküle sind etwa 20-25 bp lang und lagern sich an die komplementären Regionen einzelsträngiger mRNA-Moleküle der Zelle an, wodurch das entsprechende Protein nicht mehr synthetisiert werden kann.

HiPerFect von *Qiagen* ermöglicht eine schonende Transfektion der siRNA in die Zellen. Pro Ansatz (Ø 3,5 cm Petrischale) wurde zunächst 100 µl Opti-MEM Medium mit der gewünschten siRNA in entsprechender Konzentration gemischt und anschließend zwölf Mikroliter des HiPerFect-Reagenz hinzupipettiert. Nun wurde der Transfektionsmix für zehn Sekunden gut durchmischt, kurz herunterzentrifugiert und für zehn Minuten bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Transfektionsmix tropfenweise dem Zellkulturmedium der entsprechenden Proben hinzugefügt und für den gewünschten Zeitraum bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Die genauen Inkubationszeiten und effektivsten siRNA-Konzentrationen wurden vor Beginn eines Experiments für jedes Gen individuell bestimmt. Diese sind Kapitel 2.1.9 zu entnehmen.

2.2.6.2 Plasmid-Transfektion mittels jetPRIME

Für die transiente Transfektion von Plasmiden in Zellen wurde jetPRIME® von *Polyplus transfection™* verwendet. Hierfür wurden die Zellen so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 60-80% aufwiesen. Da jetPRIME auch in Gegenwart von Serum und Antibiotika stabil ist, konnte die Transfektion im normalen Kulturmedium durchgeführt werden. Dazu wurden für den Ansatz einer im Durchmesser 3,5 cm großen Petrischale zunächst 200 µl jetPRIME® Puffer vorgelegt und die entsprechende Menge an Plasmid-DNA darin resuspendiert. Die optimale Menge an Plasmid-DNA kann für verschiedene Plasmide variieren und wurde jeweils vor Beginn eines Versuchs experimentell bestimmt. Anschließend wurden Plasmid-DNA und jetPRIME-Puffer mittels vortexen gut gemischt und daraufhin vier Mikroliter jetPRIME®-Reagenz hinzugegeben. Nach erneutem Vortexen für zehn Sekunden und kurzem herunterzentrifugieren wurde der Transfektionsmix für zehn Minuten bei RT inkubiert, darauffolgend tropfenweise dem Zellkulturmedium der zu transfizierenden Zellen hinzugegeben und für 24 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Für größere Zellkulturgefäße wurden die Volumina entsprechend des Protokolls angepasst. Genaue Informationen der Plasmide und Mengen an eingesetzter Plasmid-DNA sind Kapitel 2.1.10 zu entnehmen.

2.2.6.3 DNA/RNA-Extraktion

Zur Extraktion von DNA bzw. RNA wurde das *Masterpure Complete DNA-RNA Purification-Kit* von Epicentre verwendet. Dazu wurden für die Nukleinsäure-Extraktion aus je einer Mio. Zellen 300 µl *Tissue and Cell Lysis Solution* eingesetzt, welcher zuvor je ein Mikroliter Proteinase K zugesetzt wurden. Diese Lösung wurde dem Zellpellet zugegeben und gründlich gemischt. Die Inkubation erfolgte bei 65°C für 15 min, wobei die Proben alle fünf Minuten gevortext wurden. Nun wurden die Proben auf 37°C abkühlen gelassen und für die Extraktion von DNA ein Mikroliter RNaseA einer Konzentration von 5 µg/µl zugegeben und gemischt, um RNA zu verdauen. Nach einer weiteren Inkubation für 30 min bei 37°C und 3-5 min auf Eis wurden der lysierten Probe 150 µl *MPC Protein Precipitation Reagent* zugegeben und alles zehn Sekunden rigoros gemischt. Nun erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 10.000 \times g und 4°C. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und das Pellet verworfen. Um nun die Nukleinsäuren zu fällen wurden 500 µl Isopropanol hinzugegeben, die Probe 30-40-mal invertiert und erneut bei 10.000 \times g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Isopropanols ohne dabei das Pellet zu lösen wurde dieses zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Schlussendlich wurde das Ethanol restlos entfernt und die DNA luftgetrocknet bevor sie in etwa 30-50 µl TE-Puffer resuspendiert wurde. Im Fall einer RNA-Extraktion wurde zu Beginn keine RNase zugeben, sondern im Anschluss an die Nukleinsäurefällung mittels Isopropanol DNase I-Lösung aus 5 µl RNase-freier DNase I und 195 µl DNase Puffer hinzugegeben, das Pellet darin resuspendiert und für die DNA für 10-30 min bei 37°C verdaut. Nun wurden 200 µl 2 \times T und C Lysis Solution zugegeben, für 5 sek gevortext und erneut 200 µl *MPC Protein Precipitation Reagent* zugegeben, 10 sek gevortext, für 3-5 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 10.000 \times g und 4°C zentrifugiert. Abschließend wurde durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und 30-40-maligem Invertieren erneut restlich vorhandene Nukleinsäuren, in diesem Fall RNA, gefällt. Anschließend an die 10-minütige Zentrifugation bei 10.000 \times g und 4°C und Entfernen des überschüssigen Isopropanols wurde auch das RNA-Pellet zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 10-35 µl TE-Puffer resuspendiert. Optional wurde abschließend noch ein Mikroliter RiboGuard RNase Inhibitor zugegeben, um einen Verdauprozess der RNA zu vermeiden. Daraufhin wurde die Konzentration der DNA bzw. RNA am Nanodrop ermittelt.

2.2.6.4 DNA-Verdau und Ligation

Um spezifisch DNA zu verdauen wurde pro 20 µl Restriktionsansatz 1 µl Restriktionsenzym (10 U/µl) und 1 µg Template DNA eingesetzt. Zudem wurden 2 µl des entsprechend für das Enzym am besten geeigneten 10 \times Puffers hinzugegeben und der Ansatz mit 16 µl Millipore-H₂O aufgefüllt. Anschließend wurde die DNA entsprechend der für das Enzym spezifisch vorgegebenen Bedingungen verdaut und darauffolgend, falls erforderlich, das Enzym für 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Genaue Informationen über verwendete Enzyme und deren spezifische Bedingungen sind Kapitel 2.1.14 zu entnehmen.

Für eine anschließende Ligation zweier DNA-Fragmente wurde die T4 Ligase von NEB verwendet. Pro 20 µl Ansatz wurden je 0,1 µg der beiden DNA-Fragmente, 2 µl des 10 \times Ligationspuffers, 1 µl der T4 Ligase sowie das entsprechend restliche Volumen Millipore-H₂O eingesetzt. Die Ligation erfolgte bei 16°C im Thermomix über Nacht.

2.2.6.5 Transformation in *E.coli NEB10β*

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurde diese in *E.coli NEB10-β* transformiert. Hierzu wurden 5 µl des Ligationsansatzes mit 45 µl Transformations-Mix, bestehend aus 35,7 µl Millipore-H₂O, 7,7 µl 10% PEG 10000 und 5 µl 10 x KCM, gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nun wurde der Mix zu 50 µl kompetenter *E.coli NEB10-β* Zellen gegeben, wiederum 20 min auf Eis und anschließend weitere 10 min bei RT inkubiert bevor 333 µl 2 x TY-Medium hinzugegeben und alles für 1 h bei 37°C inkubiert wurde. Darauffolgend wurden vergleichsweise 100 µl und der Rest des Transformations-Mix auf LB-Platten mit entsprechend zugesetztem Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C im Brutschrank über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag konnten die Kolonien gezählt, erneut fraktioniert ausgestrichen oder direkt eine Kolonie gepickt und daraus eine Vorkultur in Flüssigmedium angezogen werden.

2.2.6.6 Plasmid-Isolierung durch Maxi-Prep

Um nach Transformation und Vermehrung der gewünschten Plasmid-DNA in *E.coli NEB10-β* diese zu isolieren wurde das Maxi-Prep-Kit der Firma Qiagen verwendet. Hierzu wurden die Bakterienkulturen zunächst bei 3200 *x g* für 15 min herunterzentrifugiert. Anschließend erfolgte die Resuspension in 10 ml B1 Puffer, dem RNase zugesetzt wurde, woraufhin weitere 10 ml Puffer P2 hinzugegeben wurden, die Suspension 4-6-mal invertiert und für 5 min bei RT inkubiert wurde. Nach der Zugabe von weiteren 10 ml Puffer P3 und 4-6-maligem Invertieren wurde die Lösung 20 min auf Eis inkubiert und für 30 min bei 9500 *x g* und 4°C zentrifugiert. Nun wurde der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, abgenommen und auf die im Kit enthaltenen Qiagen-Tip 500 Säulen gegeben, welche zuvor mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert wurden. Anschließend wurden die Säulen zweimal mit 30 ml QC-Puffer gewaschen, bevor die DNA durch Zugabe von 15 ml QF-Puffer auf die Säule eluiert wurde. Daraufhin erfolgte die Präzipitation der DNA mit 10,5 ml Isopropanol bei RT und Zentrifugation bei 5000 *x g* für 60 min und 4°C. Abschließend wurde das Pellet aus Plasmid-DNA noch mit 1 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und das Pellet luftgetrocknet bevor es in einem geeigneten Volumen TE-Puffer gelöst wurde. Mit Hilfe des Nanodrops wurde nun die Konzentration der DNA ermittelt. Der anschließende Restriktionsverdau mit geeigneten Enzymen diente der Kontrolle, ob es sich bei der isolierten DNA um das gewünschte Produkt handelt.

2.2.6.7 Mycoplasmentest

Mit einer Größe von 0,2- 2 µm sind Mycoplasmen die kleinsten, zur selbständigen Vermehrung fähigen, zellwandlosen Bakterien. Mit weniger als 600 kbp ist ihr Genom sehr klein, jedoch stellen Mycoplasmen insbesondere in der biopharmazeutischen Forschung ein wiederkehrendes Problem dar, da sie das Zellwachstum inhibieren, Virusproliferation und Transfektionsraten sowie die Expression gewünschter Proteine beeinflussen können. Demzufolge kann sich eine Mycoplasmenkontamination entscheidend auf die Reproduzierbarkeit und Aussagekraft experimenteller Untersuchungen auswirken und diese verändern (Nikfarjam und Farzaneh 2012). Daher wurden neue Zelllinien zu Beginn immer dahingehend analysiert, wozu das *Mycoplasmen-Test-Kit* der Firma AppliChem verwendet wurde. Dieses basiert auf der Erkennung einer Mycoplasmen-spezifischen 16S-rRNA-Region des Mycoplasma-Genoms. Bei vorhandener Kontamination mit Mycoplasmen wird mit Hilfe

von spezifischen Primern ein 270 bp großes Produkt amplifiziert, das anschließend mittels Agarosegelelektrophorese einfach und schnell nachgewiesen werden kann. Hierbei ist lediglich eine qualitative Aussage, ob eine Kontamination vorliegt oder nicht, von Belang, weshalb ein Expressionsnachweis der Mycoplasmen-spezifischen 16S-rRNA durch den Größenvergleich mit dem zusätzlich aufgetragenen Marker und der im Kit enthaltenen Positivkontrolle ausreichend ist.

2.2.6.8 Analyse eines PCR-Produkts mittels Agarosegelelektrophorese

DNA, wie beispielsweise PCR-Produkte oder DNA nach Restriktionsverdau, können mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese anhand ihrer Größe aufgetrennt und analysiert werden. Große, negativ geladene DNA-Moleküle wandern hierbei im elektrischen Feld langsamer durch die vernetzte Agarosegelstruktur zur Anode als kleinere. Demzufolge findet man kleinere Amplifikate oder Produkte weiter unten im Gel als große. Entsprechend der zu erwartenden Größen der Produkte werden daher unterschiedliche Agarosekonzentrationen zwischen 0,6% und 2,0% eingesetzt, um eine feinere oder gröbere Struktur zu erreichen. Zur Bestimmung der Größe der Produkte wurden je nach deren Größe Marker wie der 50 bp DNA Ladder, 100 bp DNA Ladder oder 1 kb DNA Ladder mit aufgetragen.

2.2.6.9 Generierung einer *Knockout*-Zelllinie mittels CRISPR/Cas9

Mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems wurde eine für das humane RNF138-Gen defiziente U2OS- und HeLa-S-Fucci-Zelllinie generiert. CRISPR, *clustered regulatory interspaced palindromic repeats*, sind besondere Teilbereiche der bakteriellen DNA und stellen eine wichtige Komponente des bakteriellen Immunsystems dar, was es den Bakterien erlaubt virale DNA zu erkennen und zu zerstören. In diesen Bereichen wechseln sich wiederholende und variable Sequenzen, sog. *repeats* und *spacer*, ab. Zusätzliche CRISPR-assoziierte Gene, sog. Cas, codieren verschiedene Proteine, die für die Funktionalität des gesamten CRISPR/Cas-Komplexes notwendig sind. Nach der Infektion mit einem Virus werden Stücke der schädlichen Virus-DNA in die CRISPR *spacer* Region der Bakterien aufgenommen und dienen bei einer erneuten Infektion als Erkennungssequenz, wodurch vergleichbar mit einem Immunsystem die Zerstörung der Fremd-DNA eingeleitet wird. Hierbei wird die Fremd-DNA durch das Enzym Cas9 gezielt innerhalb der guide-RNA- (gRNA)-Sequenz zerschnitten und somit unschädlich gemacht. Als gRNA wird hierbei die kurze Nukleotidsequenz der CRISPR-Region (crRNA) in Verbindung mit dem Cas-Protein bezeichnet, welche komplementär an die Zielsequenz bindet und somit die Endonuklease Cas9 die Fremd-DNA gezielt zerschneiden lässt.

Diese Fähigkeit, DNA an einer bestimmten Position gezielt zu zerschneiden und zu zerstören, macht man sich in der Gentechnik zu Nutze, indem beliebig gestaltete Nukleotidsequenzen als gRNA in Organismen eingebracht werden. Somit wird die DNA des Zielorganismus an der gewünschten Stelle durchtrennt und Gene können zielgerichtet eingefügt, ausgeschaltet oder reguliert werden. Im Fall der Generierung eines *Knockouts* eines speziellen Gens in humanen Zellen macht man sich zu Nutze, dass bei dem meist verwendeten DNA-DSB-Reparaturmechanismus, der nicht-homologen Endverknüpfung (*NHEJ*; *non-homologous end joining*), die beiden DNA-Enden zumeist fehlerhaft wieder zusammengefügt werden, wodurch sich der Leserahmen verändert und das betroffene Gen seine Funktionalität verliert (Ran, Hsu *et al.* 2013).

Um die Wahrscheinlichkeit einer Mutation in dem gewünschten Gen zu erhöhen, wurde die 21 Nukleotide lange gRNA-Sequenz entsprechend einer Sequenz in einem der ersten Exons des humanen RNF138-Gens ausgewählt. Die beiden komplementären Sequenzen wurden als Oligonukleotide synthetisiert und durch Erhitzen zusammengelagert (*annealing*). Nun wurde die spezifische doppelsträngige RNF138-gRNA in den zuvor *BpiI* verdauten pSpCas9(BB)-2A-Puro Vektor PX459 von *Addgene* mittels T4 Ligase von NEB ligiert. Nach Transformation des Vektors in *E-coli NEB10-β* wurde die DNA von verschiedenen Kolonien mittels Miniprep extrahiert und anschließend für eine erste Überprüfung *BpiI* verdaut, um so Kolonien herauszufiltern, die das gewünschte Plasmid tragen. Zur weiteren Überprüfung wurde eine Kontroll-PCR mittels zweier speziell hierfür konzipierten Primer durchgeführt. Da der *forward*-Primer 25 bp des Inserts und der *reverse*-Primer einer Sequenz auf dem „*backbone*“-Vektor entspricht, konnte lediglich bei einer korrekten Klonierung der sgRNF138 in den Vektor PX459 das 515 bp große Fragment amplifiziert werden. Anschließend wurden positive Klone in einer Übernachtskultur vermehrt und mit Hilfe der Maxiprep von *Qiagen* die Plasmid-DNA isoliert.

Mit Hilfe der jetPRIME-Transfektion konnte nun das pSpCas9(BB)-2A-Puro-sgRNF138-Plasmid, auf dem neben der RNF138-spezifischen gRNA alle notwendigen Cas-Proteine, das Cas9-Enzym sowie eine Puromycin-Resistenz kodiert sind, in die gewünschten Zellen transfiziert werden. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen abtrypsiniert und einige wenige Zellen in eine große Petrischale überführt, in der sich aus Einzelzellen Kolonien bilden konnten. Weitere 24 h später erfolgte der Wechsel auf Selektivmedium, sprich Puromycin-haltigem Medium, wodurch lediglich Zellen bzw. Kolonien überleben, die das gewünschte Plasmid eingebaut hatten. Nach ausreichender Vermehrung der Zellen wurden einzelne Klone gepickt und zunächst in 24-Lochplatten und später in größere Zellkulturflaschen überführt und weiter vermehrt.

Für eine erste Kontrolle wurden Zellen der Klone mittels Lämmli lysiert und die Expression des entsprechenden Proteins, hier RNF138, im Westernblot analysiert (vgl. Abbildung 37 Kapitel 3.3.2.).

Zur weiteren Überprüfung der generierten RNF138-*Knockout*-Klone wurde mittels des *Masterpure Complete DNA-RNA-Purification Kits* genomische DNA aus den verschiedenen Klonen isoliert, um daraus anschließend mit wiederum speziell entworfenen Primer, die den gewünschten Bereich des humanen RNF138-Gens, in dem die Cas9 geschnitten hatte und daher die Mutation zu erwarten war, amplifizieren. Eventuelle Größenunterschiede des Amplifikats konnten dabei erste Hinweise auf eine vorliegende Veränderung der Gensequenz liefern. Für eine genaue Analyse wurde das gewünschte PCR-Produkt aus dem Agarosegel ausgeschnitten, aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt, um es schlussendlich sequenzieren lassen zu können. Leider war auch die Sequenzierungsanalyse in manchen Fällen nicht eindeutig, da es sein kann, dass auf den beiden Allelen unterschiedliche Mutationen im Gen entstanden sind oder gar nur ein Allel verändert wurde, wodurch ein Mix aus zwei unterschiedlichen Sequenzen entsteht, was in der Analyse der Sequenz zu keinem eindeutigen Ergebnis führt. Tritt ein solches Ereignis einer nicht eindeutig zuzuordnenden Base an exakt der Stelle auf, an der die Mutation zu erwarten ist, kann jedoch zumindest von einem heterozygoten *Knockout* ausgegangen werden.

Um jedoch zweifelfrei den *Knockout* zu belegen und zudem eine Aussage über einen homozygoten oder heterozygoten *Knockout* treffen zu können, wurde der *Knockout* abschließend mittels *in-vitro*-Transkription und anschließender Cas9-Nuklease-Reaktion überprüft (vgl. Abbildung 38 Kapitel 3.3.2.).

2.2.7 Biochemische Methoden

2.2.7.1 Zelllysate nach Lämmli

Die Proteinextraktion von Gesamtzelllysaten erfolgte mit dem Puffer nach Lämmli (Laemmli 1970). Hierbei ist es wichtig die Proben während der gesamten Durchführung auf Eis zu bearbeiten. Zunächst wird das Medium entfernt und die Zellen mit PBS^{-/-} gewaschen. Daraufhin werden zu je einer Mio. Zellen bzw. pro 3,5 cm Petrischale 100 µl 2x SDS-Probenpuffer (Lämmli-Lysepuffer) hinzugegeben, die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und die Lysate in einem Eppendorfgefäß vereint. Zum Scheren der DNA wurden die Lysate nun 3 x für 30 sec auf höchster Stufe sonifiziert. Das anschließende Erhitzen der Suspensionen im Heizblock auf 95°C für 10 min diente der Denaturierung der Proteine. Nun wurden die Zelllysate bei 13.000 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und dieser Überstand bis zur weiteren Behandlung bei -20°C gelagert.

2.2.7.2 Zelllysate für Immunpräzipitation

Für die Lyse von Zellen und die anschließende Immunpräzipitation (IP) wurde der IP-Lysepuffer verwendet. Hierzu wurde ein Zellpellet aus einer Mio. Zellen in je 200 µl IP-Lysepuffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nun erfolgte die Sonifizierung 2 x für 1 min und die anschließende Zentrifugation bei 16.000 x g für 30 min bei 4°C. Daraufhin wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proben bis zur weiteren Aufarbeitung auf Eis gelagert.

2.2.7.3 Immunpräzipitation / Ubiquitin-Pulldown mittels TUBEs

Für die klassische Immunpräzipitation (IP) wurden *Protein G Dynabeads* von *ThermoFisher* verwendet, für den *Pulldown* von ubiquitinierten Proteinen magnetische *Beads* von *LifeSensors*, an die bereits *TUBE2 (Tandem Ubiquitin Binding Entities)* gekoppelt wurden. Das Für die IP verwendetet, immobilisiertes Protein G bindet den F_c-Teil des Antikörpers, wobei Protein G im Gegensatz zu Protein A den Isotyp IgG₁ präzipitiert. Nun wurden zunächst pro Ansatz 50 µl der *Beads* in 200 µl PBS-T (PBS^{-/-} + 0,1% Tween 20) resuspendiert, im MagnetRack separiert und sobald die Lösung klar war, der Überstand abgenommen. Daraufhin wurden erneut 200 µl PBS-T hinzugegeben und die *Beads* darin resuspendiert bevor für die klassische Immunpräzipitation 1-10 µg des Primärantikörpers (je nach Herstellerangaben) hinzupipettiert und die Suspension für 2 h bei 4°C auf dem Rotationsschüttler inkubiert wurde. Zur Kontrolle der klassischen IP wurden Isotypkontrollantikörper desselben Immunglobulintyps und derselben Konzentration verwendet. Diese richtet sich nicht gegen ein spezifisches Antigen, sondern soll der Erkennung falsch positiver Reaktionen, die durch die Bindung des F_c-teils des Antikörpers verursacht wird, und so der Einschätzung von unspezifischen Bindungen des Primärantikörpers dienen. Für die Kontrolle des *TUBE-Pulldowns* wurden ebenfalls magnetische *Beads* genutzt, an die keine *TUBE2* gebunden waren. Nach Zugabe des Primärantikörpers bzw. Isotypkontrollen erfolgte ein dreimaliges Waschen des *Beads*-Antikörper-Komplexes mit BSA/PBS (PBS^{-/-} + 0,1% BSA). Dazu wurde die Suspension im MagnetRack separiert, der Überstand abgenommen und verworfen und der Komplex anschließend in 200 µl BSA/PBS resuspendiert bevor eine erneute Separierung im MagnetRack erfolgte. Vor der Zugabe des Zelllysats zum *Bead*-Antikörper-Komplex wurden etwa 30-40 µl Zelllysat abgenommen, um für

die spätere Analyse auch ein Gesamtzelllysate (*WCL = whole cell extract; input*) vor der Immunpräzipitation auf das SDS-Gel auftragen zu können. Nach dem Waschen wurde nun das Zelllysate (200 µg – 1 mg Gesamtproteinmenge je nach Expressionslevel des zu untersuchenden Proteins) zum *Bead*-Antikörper-Komplex gegeben, resuspendiert und für 3 h bei 4°C, im Fall des Ubiquitin-*TUBE-Pulldowns* über Nacht im Kühlschrank bei 4°C, auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Je nach zu untersuchendem Protein fand zuvor ein *Pre-clearing* des Zelllysates statt, bei dem das Lysat zu lediglich gewaschenen *Beads* ohne Antikörper gegeben und für 1 h inkubiert wurde. Im Anschluss an die dreistündige Inkubation wurde die Suspension erneut im MagnetRack separiert und 3 x mit 200 µl BSA/PBS gewaschen. Schlussendlich wurde der *Bead*-Antikörper-Komplex in 30-40 µl 3 x Blue Loading Buffer (+DTT) gelöst und die Proben für 15 min im Heizblock bei 95°C eluiert. Die Gesamtzelllysate wurden ebenfalls mit 3x Blue Loading Buffer (+DTT) versetzt und gleicher Massen erhitzt. Nun wurden je 15 µl Probe auf ein SDS-Gel aufgetragen und diese über Westernblot analysiert.

2.2.7.4 Vorbereitung der Zellen für die Sortierung am Cell Sorter

Für die Sortierung der Zellen am *Cell Sorter* wurden diese zunächst mittels Accutase abgelöst, vereinzelt und in ein 50 ml Falcon, in das 20 ml kaltes PBS^{-/-} vorgelegt wurde, überführt. Nun wurde die Zellzahl der Suspension bestimmt und anschließend die Zellsuspension bei 110 x g für 10 min bei 4°C herunter zentrifugiert. Nachdem der Überstand vorsichtig abgenommen bzw. dekantiert wurde, galt es die Zellen in entsprechendem Volumen PBS^{-/-} zu resuspendieren, um eine Lösung von 10 Mio. Zellen pro ml PBS^{-/-} zu erhalten und so die *target event rate* am *Cell Sorter* auf 10.000 einstellen zu können. Zuletzt wurde die Zellsuspension über einen Filterdeckel in ein FACS-Röhrchen überführt. Dieser Filterschritt half die Zellen noch einmal zu vereinzeln und somit optimal für die Sortierung am *Cell Sorter* vorzubereiten.

2.2.7.5 Zellsortierung am Cell Sorter

Während der gesamten Sortierung am *Cell Sorter* wurde die Zellsuspension gekühlt auf 7°C gehalten. Die Einstellung des Zelltiters auf 10 Mio. Zellen pro ml erlaubte die *target event rate* des Sortiervorgangs auf 10.000 zu erhöhen und somit eine schnelle Sortierung zu erreichen. Anhand der stabil integrierten Fluoreszenzgekoppelten Zellzyklusmarker der Hela.S-Fucci-Zellen konnten diese in G1- bzw. G2-Phase-Zellen unterschieden und aufgetrennt werden. Generell ermöglicht die Durchflusszytometrie jede einzelne Zelle anhand ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenzfärbung zu untersuchen. Der *Cell Sorter* macht es zudem möglich neben der Analyse zwei unterschiedliche Populationen gezielt zu sammeln und somit für weitere Untersuchungen zu erhalten. Durch die Trägerflüssigkeit wird zunächst eine laminare Strömung erzeugt, der sog. Hüllstrom. Aufgrund des geringen Querschnitts der Kapillare wird durch hydrodynamische Fokussierung ein dünner Probenstrahl erzielt, wodurch der Abstand zwei aufeinanderfolgender Zellen so vergrößert wird, dass jeweils eine einzelne Zelle am Laserstrahl vorbei geführt und dementsprechend als Einzelzelle analysiert werden kann (Abbildung 27A). Da verklebte Zellen nicht mehr vereinzelt werden können, ist die Generierung von Einzelzellen bei der Vorbereitung der Zellen für die Analyse am Durchflusszytometer bzw. *Cell Sorter* und spätere Sortierung extrem wichtig. Der *Cell Sorter* produziert einen konstanten Strom an Tropfen, in denen die Zellen liegen. Unter hohem Druck wird die Flüssigkeit hierbei durch eine kleine Öffnung, die *Nozzle*, gepresst

und so die Tropfen erzeugt. Enthält ein Tropfen eine Zelle mit den gesuchten Parametern wird diese elektrisch aufgeladen und über ein Spannungsfeld in die gewünschte Richtung gelenkt (Abbildung 27B). Neben der Fluoreszenz wird das Streulicht einer Zelle gemessen, das entsteht, sobald die Zelle den Laserstrahl kreuzt.

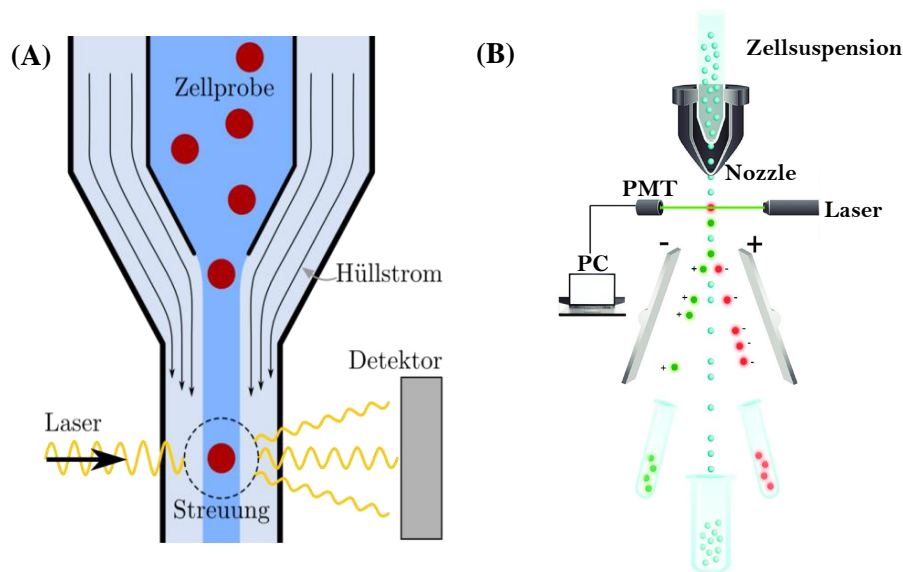


Abbildung 27: Schematischer Aufbau zur Funktionsweise eines Cell Sorters. Die zu untersuchende Zellsuspension fließt durch eine Kuvette, in der diese mittels einer laminar-strömenden Hüllflüssigkeit auf einem Querschnitt von einigen Mikrometern Ausdehnung hydrodynamisch fokussiert wird. Im Vorbeifließen wird die Suspension mit einem Laser bestrahlt und das Streulicht detektiert (A). Um einzelne Zellen mit gewünschten Eigenschaften herauszufiltern wird die Flüssigkeit am Sorter durch die *Nozzle* gepresst, wodurch kleine Tropfen erzeugt werden, die elektrisch aufgeladen und somit über ein Spannungsfeld in die gewünschte Richtung gelenkt werden können (B). https://www.ptb.de/cms/fileadmin/_processed_/csm_flow_cytometer_de_8ecb2094ff.png (A) und https://www.researchgate.net/profile/Tuhin_Santra/publication/299166012/figure/fig6/AS:614355703971860@1523485222561/Fluorescence-activated-cell-sorting-FACS-The-suspended-cells-are-subjected-to.png (B) (Stand: 03.10.19 12:31 Uhr)

Durch Messung des Streulichts in verschiedene Richtungen erhält man auf einfache Weise unterschiedliche, wichtige Informationen über die Zelle. Gemessen wird das Streulicht an zwei Stellen. Zum einen das sog. Vorwärtsstreulicht ($FSC = forward\ scatter$) in nahezu der Richtung des ursprünglichen Strahls und zum anderen im Winkel von etwa 90° zum ursprünglichen Strahl das sog. Seitwärtsstreulicht ($SSC = side\ scatter$). Über den Vorwärtsstreulichtdetektor kann hierbei auf die Größe der Zellen geschlossen werden, da kleinere Zellen ein kleineres Vorwärtsstreulicht verursachen als größere Zellen, während der Seitwärtsstreulichtdetektor die Granularität misst. Befinden sich in der Zelle beispielsweise sehr viele Lysosomen, sprich ist die Granularität/Körnigkeit der Zelle groß, verursacht sie ein großes Seitwärtsstreulicht (Abbildung 28).

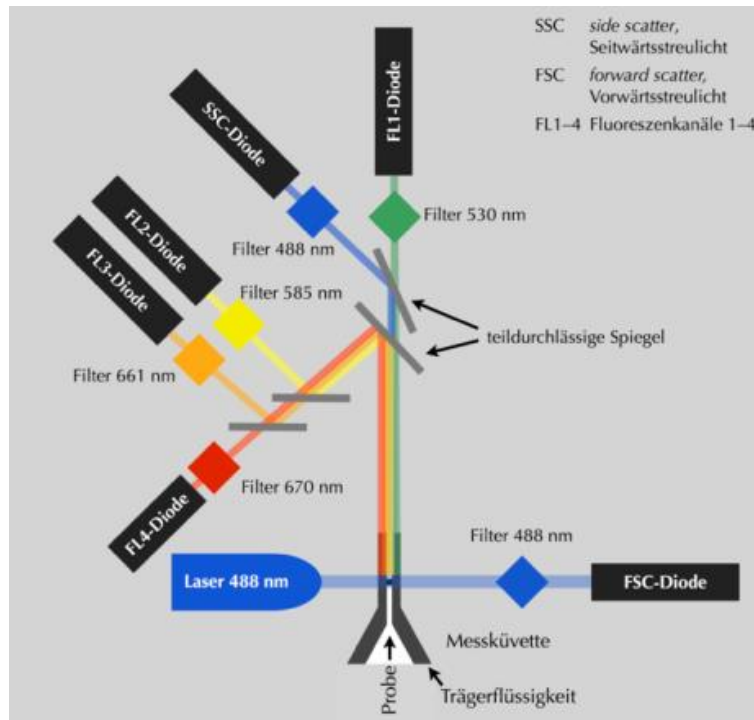


Abbildung 28: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers. Die fokussierte Probe wird mit einem Laser (hier 488 nm) bestrahlt und das durch die Zellen gestreute Licht auf verschiedene Detektoren geleitet. Über das Vorwärtsstreulicht (nahezu in Richtung des Lasers) können Rückschlüsse auf die Größe der Zelle gezogen werden, wohingegen das Seitwärtsstreulicht (im 90° Winkel zum Laser) eine Aussage über die Granularität der Zelle gibt. Vier Fluoreszenzsignaldetektoren und -filter geben Aufschluss über eventuelle Fluoreszenzen der einzelnen Zellen. <https://upload.wikimedia.org/Duchflusszytometer.png/624px-Duchflusszytometer.png> (Stand: 02.10.19 10:19 Uhr)

Durch die Messung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts und spezieller graphischer Auftragung in einem Histogramm konnten so zunächst die lebenden Zellen aus der Gesamtpopulation herausgefiltert werden. Über die Auftragung der Höhe gegen die Breite des Vorwärtsstreulichts konnten in einem nächsten Schritt die Einzelzellen von den Dubletten unterschieden und getrennt werden, was wichtig ist, um schlussendlich lediglich Einzelzellen zu sortieren, deren Eigenschaften exakt bestimmt werden konnten. Mit Hilfe von *Gates* in den einzelnen Histogrammen ist es so möglich, Zellen zu bestimmen, auf denen alle gewünschten Eigenschaften zutreffen und ausschließlich diese herauszufiltern (Abbildung 29).

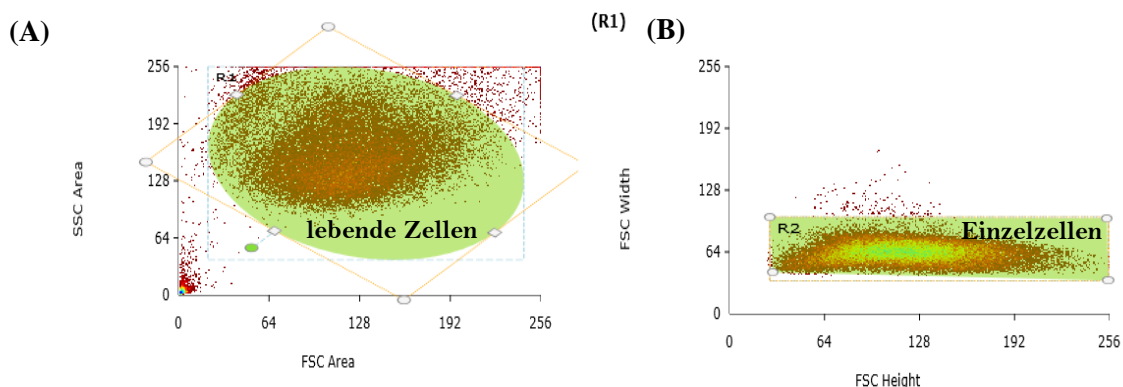


Abbildung 29: Gaten lebender Einzelzellen mit Hilfe der Messung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts im Cell Sorter anhand spezieller graphischer Auftragungen. Durch die Auftragung der Fläche des Vorwärtsstreulichts gegen die Fläche des Seitwärtsstreulichts können lebende von toten Zellen unterschieden werden (A), wohingegen die Auftragung der Höhe des Vorwärtsstreulichts gegen die Breite des Vorwärtsstreulichts das Herausfiltern von Dubletten ermöglicht (B).

Im S3 *Cell Sorter* von Biorad sind zwei Laser (488 nm und 561 nm) integriert, die es ermöglichen verschiedene Fluoreszenzsignale unter anderem im grünen (Emission 505 nm) und roten (Emission 565 nm) Bereich über die beiden Filterkanäle FL1-525/30 und FL2-586/25 zu analysieren. Somit konnten die in dieser Arbeit verwendeten HeLa.S-Fucci-Zellen über ihre beiden stabil integrierten grün- und rot-fluoreszierenden Zellzyklusmarker optimal untersucht, in G1- und G2-Phase-Zellen aufgetrennt und für weitere Untersuchungen eingefroren werden (Abbildung 30). Hierzu wurde nach der Sortierung die Zellzahl der unterschiedlichen Populationen bestimmt, die Zellen durch Zentrifugation bei 500 \times g bei 4°C für 10 min gesammelt, der Überstand vorsichtig abgenommen und ein Pellet aus je 1 Mio. Zellen direkt in flüssigem Schickstoff schockgefroren bevor es bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert wurde.

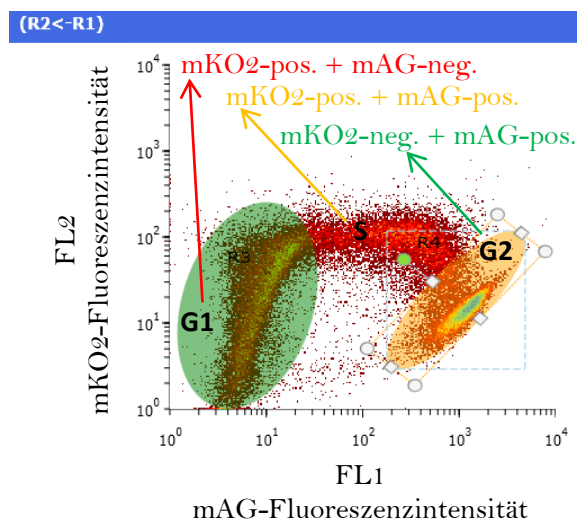


Abbildung 30: Bestimmung von G1- und G2-Phase- HeLa.S-Fucci-Zellen anhand ihrer beider stabil integrierten zellzyklusspezifischen Fluoreszenzmarker im S3 *Cell Sorter* von Biorad. HeLa.S-Fucci-Zellen exprimieren mKO2-hCdt1 und mAG1-hGem, die beide über einen 488 nm Laser angeregt werden können. Anschließend werden die Fluoreszenzsignale für mAG bei 505 nm und für mKO2 bei 565 nm über die beiden Filter FL1-525/30 und FL2-586/25 detektiert. Durch Auftragung der Intensität des Fluoreszenzsignals von mAG gegen jenes von mKO2 können mKO2-positive, mAG-negative G1-Phase-, mKO2-positive und mAG-positive S-Phase als auch mKO2-negative und mAG-positive G2-Phase-Zellen unterschieden und gesammelt werden.

2.2.7.6 Proteinbestimmung nach Lowry

In dieser Arbeit wurde die Proteinkonzentration der Zelllyste nach der Lowry-Methode (Lowry, Rosebrough *et al.* 1951) mit Hilfe des DC Protein-Assays von BioRad bestimmt. Bei dieser Reaktion reagieren die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin mit einer alkalischen Kupfer-Tetrat-Lösung und dem Folin-Reagenz. Dazu werden Doppelbestimmungen mit je 5 μ l Probe (Lämmli-Lysate 1:10 verdünnt) durchgeführt. Zur Probe werden anschließend 25 μ l Reagenz AS (Reagenz A im Verhältnis 50:1 zu Reagenz S) und 200 μ l Reagenz B gegeben, 15 min unter Schütteln inkubiert und darauffolgend die Extinktion bei 690 nm am ELISA-Reader ermittelt. Die Proteinkonzentration wurde schlussendlich mit Hilfe der BSA-Eichgerade bestimmt.

2.2.7.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE können Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die Proben werden hierzu mit Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) versetzt, sodass die Proteine denaturiert und Sekundär- sowie Tertiärstrukturen aufgebrochen werden. Die Zugabe von Dithiothreitol (DTT) bzw. β -Mercaptoethanol (β -ME) diene dazu zusätzlich Disulfidbrücken zu spalten. Zur Auftrennung der denaturierten Proteine ihrer Größe nach wurden die Proben auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und anschließend elektrische Spannung angelegt, sodass die negativ geladenen Proteine durch das Gel laufen. Klassischerweise besteht das Polyacrylamidgel aus zwei Teilen, dem Sammelgel sowie dem Trenngel. Ersteres dient zur Konzentrierung der Proben auf ein kleines Gelvolumen und besteht in der Regel zu 5-6% aus Polyacrylamid. Dahingegen kann die Polyacrylamidkonzentration im Trenngel zwischen 4-20% liegen und dient der eigentlichen Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe. Kleinere Proteine wandern hierbei schneller durch das Gel als größere. In der Regel wurden 10%-ige oder 4-15%-ige Gradientengele der Firma BioRad verwendet. Zur Proteinauftrennung wurden die Gele in eine Elektrophoresekammer gespannt und diese mit 1 x Laufpuffer gefüllt. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit Lämmli-Ladepuffer (+ β -ME) versetzt, 3 min bei 95°C denaturiert und anschließend die entsprechende Menge an Protein auf das SDS-Gel aufgetragen. Als Standard wurde zudem der Marker *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* aufgetragen, um anhand dessen später die Größe der Proteine bestimmen zu können.

2.2.7.8 Westernblot

Für den abschließenden immunologischen Nachweis der Proteine, wurden diese in einem *semi-dry* Verfahren vom SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Hierzu wurde das Trans-Blot®Turbo™ Blotting System von Biorad verwendet. Aufgrund des anionischen Tensids SDS weisen alle Proteine eine konstant negative Ladung auf, da dieses die Eigenladung von Proteinen überdeckt. Dies wiederum wird ausgenutzt, um die negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld in Richtung der Anode wandern zu lassen und somit auf die Nitrocellulosemembran zu übertragen.

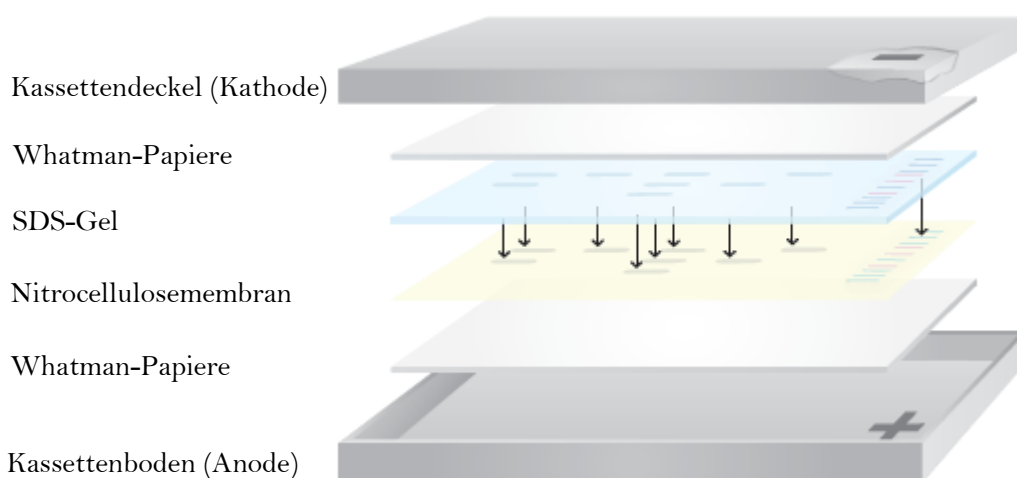


Abbildung 31: Schematischer Aufbau eines Westernblots (modifiziert nach dem Handbuch des Trans-Blot®Turbo™ Blotting Biorad). Die Proteine wurden mittels eines elektrischen Feldes vom SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, um diese anschließend immunologisch nachweisen zu können.

Der schematische Aufbau des Westernblots kann Abbildung 31 entnommen werden. Whatman-Papiere als auch Nitrocellulosemembran wurden zuvor in 1 x Turbo-Transfer-Puffer getränkt. Der Blot erfolgte standardmäßig bei 1 A und etwa 10–20 V für 30 min. Für die Übertragung von ausschließlich großen Proteinen über 70 kDa wurde die Dauer auf 45 min verlängert.

2.2.7.9 Immunologischer Nachweis und Detektion

Der Proteinnachweis der auf die Nitrocellulosemembran übertragenen Proteine erfolgte immunologisch. Durch 30-minütiges Schwenken der Nitrocellulosemembran in 5%-igem Milchpulver in TBS-T wurden zunächst alle unspezifischen Bindestellen geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem entsprechend verdünnten Erstantikörper (siehe Kapitel 2.1.7) über Nacht bei 4°C oder alternativ für 1,5 h bei RT auf dem Rotationsschüttler. Das darauffolgende dreimalige Waschen mit TBS-T diente dazu sämtliche Rückstände des nicht gebundenen Primärantikörpers zu entfernen. Nun wurde die Membran mit dem entsprechenden Zweitantikörper (siehe Kapitel 2.1.8) für 1 h ebenfalls auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Im Fall von direkt gekoppelten Primärantikörpern entfiel die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Membran in TBS-T wurden die Proteine über HRP mittels Chemilumineszenz und mit Hilfe der CCD-Kamera (*charge coupled device camera*) detektiert. Hierzu wurde je nach Größe der zu entwickelnden Membran 0,5–1 ml Reagenz A/B, welches unmittelbar bevor der Detektion im Verhältnis 40:1 (Reagenz A zu Reagenz B) gemischt wurde, auf die Membran gegeben und gleichmäßig verteilt. Die Meerrettichperoxidase (HRP) katalysiert hierbei die Umsetzung eines Dioxetans in seine oxidierte Form in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (Veitch 2004). Nun kann die optische Strahlung (Lumineszenz) gemessen werden, die beim Übergang vom angeregten Zustand in den Grundzustand entsteht (Abbildung 32).

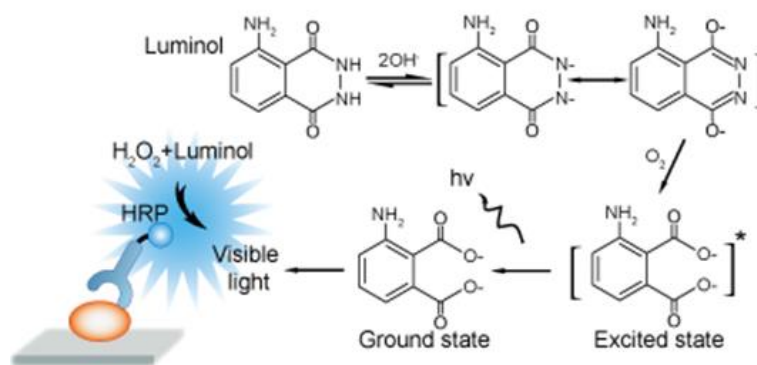


Abbildung 32: Schema der Immundetektion und Mechanismus der HRP-Chemilumineszenzreaktion. An das fixierte Antigen auf der Nitrocellulosemembran bindet der Primärantikörper. An diesen wiederum bindet spezifischer HRP-gekoppelter Sekundärantikörper. In Gegenwart von H_2O_2 katalysiert die HRP die Umsetzung eines Dioxetans (z.B. Luminol) in seine oxidierte Form, wodurch dessen Lumineszenz mittels CCD-Kamera gemessen werden kann. Modifiziert nach <https://www.creative-diagnostics.com/images/Chemiluminescence-Immunoassay-2.png> (Stand: 03.10.19 12:42 Uhr)

Nach 5-minütiger Inkubation im Dunkeln konnte das Chemilumineszenzsignal am Peqlab mittels der CCD-Kamera ausgelesen werden (Alegria-Schaffer, Lodge *et al.* 2009). Über eine Lichtquelle wird die mit Detektionsreagenz beschichtete Membran mit Licht einer speziellen Wellenlänge angeregt. Filter sammeln das

emittierte Licht bei 425 nm Wellenlänge, sodass dieses schlussendlich in ein digitales 2D-Bild umgewandelt werden kann. Dabei ist die Intensität der Signale proportional zur Menge des produzierten Lichts und damit proportional zur Proteinmenge. Die Lichtemission tritt hierbei nur während der Enzym-Substrat-Reaktion auf. Daher endet das Signal sobald das Substrat in der Nähe des Enzyms aufgebraucht ist, weshalb die Detektion nach 5-minütiger Inkubation der Reagenzien erfolgte.

3. Ergebnisse

3.1. Ubiquitinierung – eine posttranslationale Modifikation zur Regulation der DNA-End-Resektion in der DNA-Schadensantwort

Neben Proteinexpressionen reguliert das Ubiquitin-Proteasom-System auch Prozesse wie die DNA-Reparatur (Xie 2010). So werden die beiden Hauptdoppelstrangbruch-Reparaturmechanismen NHEJ (Nicht-homologe Endverknüpfung) und HR (Homologe Rekombination) ebenfalls über das Proteasom beeinflusst (Krogan, Lam *et al.* 2004). Das Tumorsuppressorgen BRCA1 (*BR*east *C*ancer 1) steht in Verbindung mit der Aktivität von Ubiquitin-Ligasen und ist ein wichtiger Faktor der DNA-Reparatur (Starita und Parvin 2003). Mit Fokus auf die DNA-End-Resektion und deren Regulationsmechanismen nimmt BRCA1 im Komplex mit CtIP eine resektionsfördernde Rolle ein und wird beschrieben, im Zuge der HR die Ubiquitinierung des Resektionsfaktors CtIP zu katalysieren (Yu, Fu *et al.* 2006). 53BP1 im Zusammenspiel mit RIF1 hingegen wirken der Resektion entgegen und fördern Reparatur über die klassische Form des NHEJ (*classical NHEJ* = c-NHEJ) (Bothmer, Robbiani *et al.* 2010, Chapman, Barral *et al.* 2013, Escribano-Diaz, Orthwein *et al.* 2013, Zimmermann, Lotterberger *et al.* 2013). Vor dem Hintergrund, dass die DSB-Reparatur nach hoch-LET-Bestrahlung nicht nur in S/G2, wo resektionsabhängige Reparatur über HR möglich ist, sondern interessanterweise auch in G1 vermehrt resektionsabhängig verläuft (Yajima, Fujisawa *et al.* 2013, Auerbeck, Ringel *et al.* 2014) und dass die Proteinmodifikation durch Ubiquitinierung in der DDR, der Regulation der DSB-Reparatur und auch der Resektionsregulation eine wichtige Rolle einnimmt, wurde Ubiquitinierung nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten näher untersucht. In Abbildung 33 dargestellte Ergebnisse lieferten hierbei einen ersten Hinweis darauf, dass Modifikation von Proteinen durch Ubiquitinierung von entscheidender Bedeutung sein könnte, da Ubiquitin-Analysen mittels Ubiquitin-Pulldown nach Bestrahlung und vor allem nach hoch-LET-Bestrahlung mit Eisenionen verstärkt ubiquitinierte Proteine in G1 erkennen ließen (Abbildung 33).

Auf Grundlage dessen wurde in der vorliegenden Arbeit die Relevanz der Proteinubiquitinierung für die Resektionsregulation in G1 nach Induktion komplexer Schäden weiter untersucht.

3.2. Funktion der Ubiquitin-Ligase RNF8 nach hoch-LET-Bestrahlung in G1

In der G1-Zellzyklusphase wurde in veröffentlichten Studien vornehmlich die Ubiquitin-Ligase RNF8 zur Regulation der DNA-Schadensantwort beschrieben. Zum einen, um andere Reparaturproteine an die Stelle des DNA-Schadens zu rekrutieren, wie beispielsweise 53BP1 im Zusammenspiel mit RNF168 (Hu, Wang *et al.* 2014, Panier und Boulton 2014, Nakada 2016). Und zum anderen, um Proteine, wie zum Beispiel den Resektionsantagonisten Ku80, über eine K48-Ubiquitinierung vom Schaden zu entfernen und so Resektion zu begünstigen (Feng und Chen 2012). Ismail, Gagne *et al.* (2015) beschrieben zudem, dass RNF8 für die Ubiquitinierung von Ku80 speziell in G1-Phase-Zellen verantwortlich ist. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die posttranslationale Modifikation von Proteinen durch Ubiquitinierung bei der Regulation der DDR nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenqualitäten speziell in humanen G1-Phase-Zellen und Induktion komplexer Schäden relevant ist (Abbildung 33), sollte nun analysiert werden, ob die Ubiquitin-Ligase RNF8

hierbei möglicherweise eine Rolle spielt. Hierzu wurden HeLa.S-Fucci-WT und solche, in denen siRNA-vermittelt die Expression von RNF8 herunterreguliert war (vgl. Kapitel 2.1.9 und 2.2.6.1) mit einer Dosis von 30 Gy Röntgen oder Eisenionen bestrahlt, anschließend 1 h nach Bestrahlung spezifisch Zellpellets von jeweils einer Millionen G1-Phase-Zellen anhand des rot-fluoreszierenden G1-Phase-Markers Cdt1 generiert, um im Folgenden die Ubiquitinierung mittels *TUBE-Pulldown* (*TUBE* = *Tandem Ubiquitin Binding Entities*) untersuchen zu können (vgl. Kapitel 2.2.7.3). Für spätere Vergleichszwecke wurde immer mit derselben Anzahl an Zellen pro Zellpellet gearbeitet, dennoch wurde neben den an die Ubiquitin-*TUBE-Beads* gebundenen Proteinen (*bound*) auch immer eine Probe des für den *Pulldown* verwendeten Lysats (*input*) auf ein SDS-Gel aufgetragen, um am Ende auf dieses *input*-Signal normieren und die Ergebnisse so quantifizieren zu können. Die beiden Ubiquitin-Blots der eingesetzten (*input*) und schließlich an die Ubiquitin-*Beads* gebundenen Fraktion (*bound*) von G1-Phase-Zellen nach Bestrahlung mit Röntgen bzw. Eisenionen sind in Abbildung 33 dargestellt. Dass in der *bound*-Fraktion keinerlei Proteine in der Kontrolle, die lediglich *Beads* ohne gebundene *TUBEs* enthielt, nachgewiesen wurden, bestätigte zunächst eindrucksvoll die Spezifität des Assays. Die quantitative Analyse in WT-Zellen ließ, wie zuvor bereits erwähnt, nach Bestrahlung einerseits und nach hoch-LET Eisenionenbestrahlung andererseits eine deutliche Zunahme an durch Ubiquitinierung posttranslational modifizierten Proteinen im Vergleich zu unbestrahlten bzw. mit niedrig-LET Röntgen bestrahlten Proben erkennen. Der Blot zeigte, dass ubiquitinierte Proteine vor allem im kDa-Bereich von über 70 kDa verstärkt auftraten. Ionenbestrahlte G1-Phase-Wildtyp (WT) (blau) im Vergleich zu RNF8-depletierten (WT + RNF8 kd) (orange) Zellen zeigten, dass die Herunterregulation der Ubiquitin-Ligase RNF8 die zuvor beobachtete strahlungs- und LET-abhängige Zunahme an ubiquitinierten Proteinen in WT-Zellen auf ein Level, vergleichbar zu den unbestrahlten Proben, eindämmte. Bei dem hier in Abbildung 33 gezeigten Blot handelt es sich um einen Ausschnitt des in Abbildung 40 komplett dargestellten Blots. Die Verifizierung der RNF8-*Knockdown*- (RNF8 kd) Effizienz ist ebenfalls in Kapitel 3.3.3 in Abbildung 39 aufgezeigt.

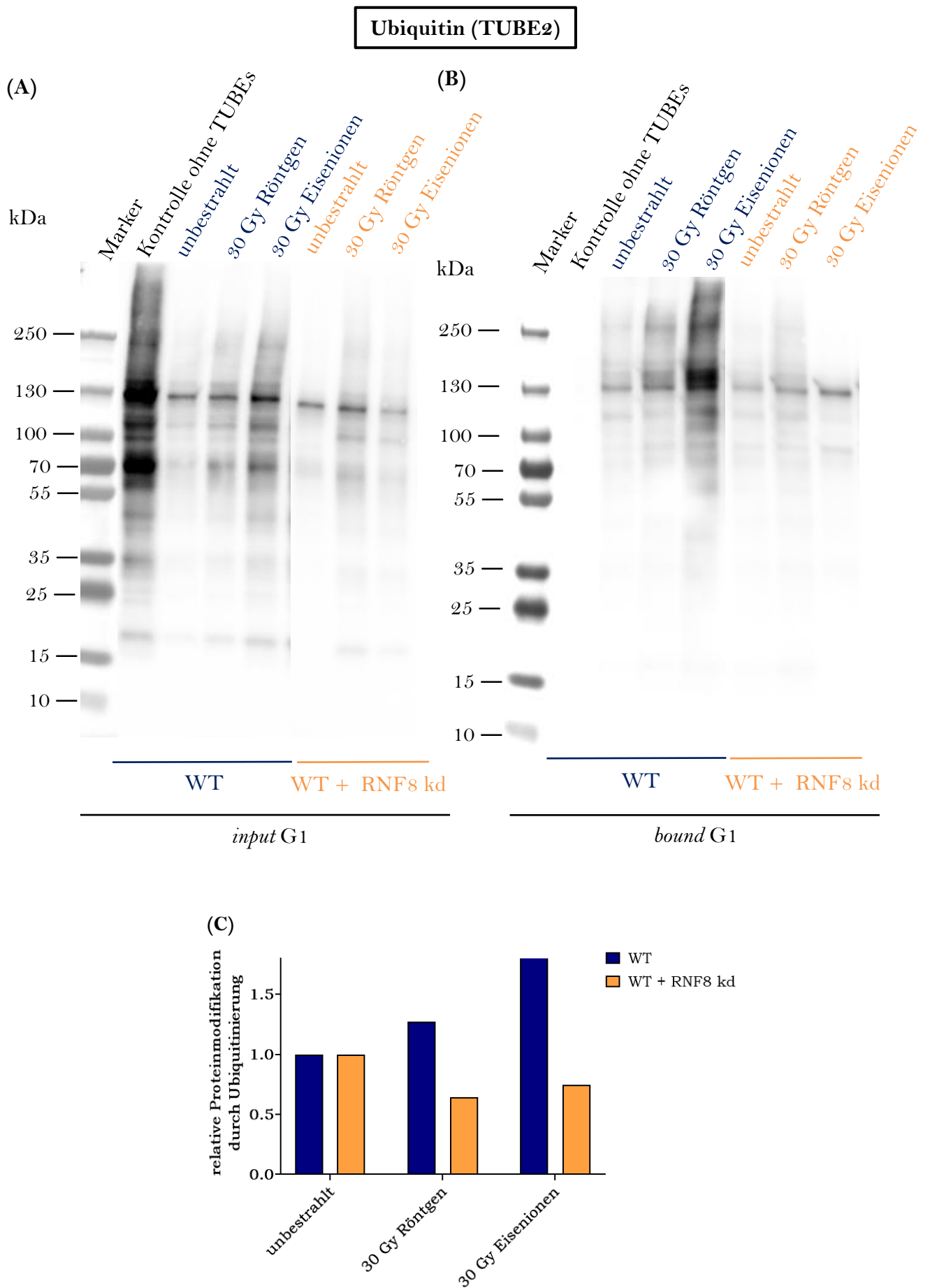


Abbildung 33: Während die Proteinmodifikation durch Ubiquitinierung im Fall der WT-Zellen von unbestrahlten über Röntgen bis hin zu Eisen-bestrahlten Zellen zunimmt, konnte nach Depletion der Ubiquitin-Ligase RNF8 und Bestrahlung mit Röntgen oder Eisenionen keine verstärkte Ubiquitinierung beobachtet werden. Humane Zervixkarzinomzellen mit stabil integriertem Fucci-System (Hela.S-Fucci-WT) und jene mit zusätzlichem siRNA-induziertem RNF8 kd (Hela.S-Fucci-WT + RNF8 kd) wurden mit 30 Gy Röntgen oder 30 Gy Eisenionen am SIS (Primärenergie: 1 GeV/u; LET: 155 keV/μm) bestrahlt und 1 h nach Bestrahlung am *Cell Sorter* zellzyklusspezifisch sortiert. Zudem wurden unbestrahlte Proben mitgeführt und ebenfalls sortiert. Nun wurden je 1 Mio. bestrahlte sowie unbestrahlte G1-Phase-WT (blau) und WT + RNF8 kd (grün) Zellen mittels IP-Lysepuffer lysiert und daraufhin sämtliche ubiquitinierte Proteine an die magnetischen Ubiquitin-*TUBE-Beads* (*TUBE = Tandem Ubiquitin Binding Entities*) gebunden. Anschließend konnten alle ubiquitinierten Proteine im Westernblot durch Anfärben mit *TUBE2* analysiert werden. Der *Input* beschreibt die Eingangsproteine, die im *Pulldown* eingesetzt wurden (A), wohingegen die gebundene Fraktion (*bound*) alle ubiquitinierten, *TUBE*-gebundenen Proteine beschreibt (B). In der Kontrolle wurden *Beads* verwendet, an die keine *TUBEs* gebunden waren, womit die Funktionsfähigkeit des Ubiquitin-*Pulldowns* nachgewiesen werden konnte. Die quantitative Analyse erfolgte mit der Software ImageJ (C). In diesem Fall wurde das Level an durch Ubiquitinierung modifizierten Proteinen auf den jeweiligen *input* und anschließend die jeweilige unbestrahlte Probe normiert.

3.2.1. Depletion von RNF8 hat keine Auswirkungen auf die RPA-Foci-Bildung nach Bestrahlung mit alpha-Teilchen

Angesichts dessen, dass RNF8 einerseits in G1 agiert (Ismail, Gagne *et al.* 2015) und andererseits bei der Ubiquitinierung und der folgenden Ablösung des Resektionsantagonisten Ku80 vom Schaden involviert ist (Feng und Chen 2012), wurde der Einfluss von RNF8 auf die Resektion nach Induktion komplexer Schäden in G1 untersucht. Hierfür wurden U2OS-Zellen einem 48-stündigen siRNA-induzierten RNF8-*Knockdown* unterzogen (vgl. Kapitel 2.1.9 und 2.2.6.1). Aufgrund der Tatsache, dass wie zuvor erwähnt mehrfach gezeigt werden konnte, dass die Ubiquitin-Ligase RNF8 für die Rekrutierung von 53BP1 essentiell ist (Hu, Wang *et al.* 2014, Panier und Boulton 2014, Nakada 2016), konnte die Herunterregulation von RNF8 durch Auszählung der 53BP1-Foci überprüft werden. In RNF8 kd Zellen im Vergleich zu mock kd Zellen war die Anzahl an 53BP1-Foci pro Zellkern nach Bestrahlung mit 2 Gy alpha-Teilchen signifikant verringert, was den RNF8 kd bestätigte (Abbildung 34A). Immunfluoreszenzfärbungen gegen RPA als Resektionsmarker und CENP-F als Zellzyklusmarker dienten als Grundlage der Resektionsanalyse (vgl. Kapitel 2.2.4.4). Die Auswertung der RPA-Foci nach Induktion komplexer Schäden durch alpha-Teilchen-Bestrahlung ist Abbildung 34B zu entnehmen (vgl. Kapitel 2.2.3.2). Hierbei zeigte sich unabhängig der untersuchten Zellzyklusphase keine signifikante Veränderung der Anzahl an RPA-Foci in mock kd verglichen mit RNF8 kd Zellen.

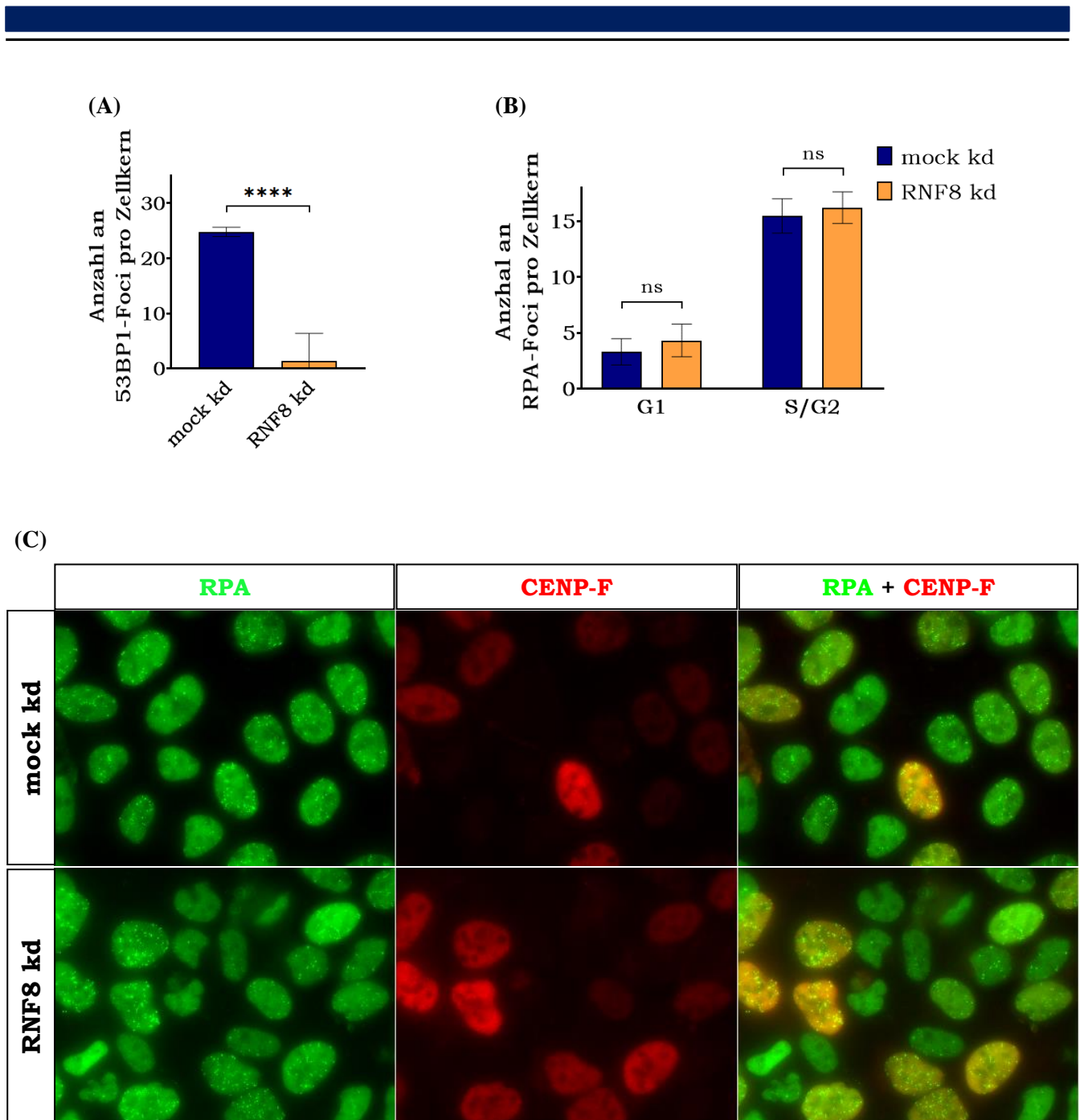


Abbildung 34: In beiden Zellzyklusphasen hat die Depletion von RNF8 nach alpha-Teilchen-Bestrahlung keinen Einfluss auf die Anzahl der RPA-Foci pro Nukleus. Humane Osteosarkomzellen (U2OS-Zellen), in denen mittels spezifischer RNF8-siRNA die Gen- und folglich Proteinexpression von RNF8 herunterreguliert wurde (RNF8 kd) oder mock transfizierte (mock kd) Zellen wurden mit 2 Gy alpha-Teilchen (LET: ~150 keV/ μ m) bestrahlt. 1 h nach Bestrahlung wurden die Proben fixiert und anschließend immunhistochemisch gegen RPA und CENP-F gefärbt, wobei CENP-F als Zellzyklusmarker diente. Pro Zellzyklusphase wurden die RPA-Foci von mindestens 50 Zellen ausgewertet ($n = 1$). Die durchschnittliche Anzahl an RPA-Foci in der jeweiligen Zellzyklusphase der unbestrahlten Probe wurde abgezogen. Zwischen mock kd und RNF8 kd Zellen war weder in G1 noch in S/G2 ein signifikanter Unterschied in der Anzahl an RPA-Foci ersichtlich (B). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts ($SEM = \text{standard error of the mean}$). Die statistische Signifikanz wurde mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft; ns = nicht signifikant; (****) = $P < 0,0001$. Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von RPA-Foci in CENP-F-positiven (S/G2-Phase) und CENP-F-negativen (G1-Phase) mock kd bzw. RNF8 kd U2OS-Zellen 1 h nach Bestrahlung mit alpha-Teilchen (LET: ~150 keV/ μ m) (C). Die RNF8-Knockdowneffizienz wurde durch Zählung der 53BP1-Foci in mock kd im Vergleich zu RNF8 kd Zellen bestimmt. Es wurden signifikant weniger 53BP1-Foci in RNF8-depletierten im Vergleich zu mock transfizierten Zellen gezählt (A).

3.2.2. Erhöhte Anzahl an RPA-Foci in 53BP1-depletierten Zellen nach alpha-Teilchen-Bestrahlung

Diverse Veröffentlichungen beschreiben das antagonistische Zusammenspiel von 53BP1 im Komplex mit RIF1 (*Rap interacting factor 1*), die der Resektion entgegenwirken, und BRCA1 zusammen mit CtIP (*C-terminal binding protein interacting protein*), die eine resektionsfördernde Rolle einnehmen (Bothmer, Robbiani *et al.* 2010, Chapman, Barral *et al.* 2013, Escibano-Diaz, Orthwein *et al.* 2013, Zimmermann, Lottersberger *et al.* 2013). Auch der Resektionsantagonist 53BP1 wird im Verlauf der DDR durch Ubiquitin-Ligasen posttranslational modifiziert und aktiviert (Bohgaki, Bohgaki *et al.* 2013, Hu, Wang *et al.* 2014). Hu, Wang *et al.* (2014) beschrieben die Wichtigkeit der beiden Ubiquitin-Ligasen RNF168 und RNF8 für die Regulation von 53BP1. Die Ubiquitinierung des Resektionsantagonisten durch RNF8 und RNF168 gilt als Voraussetzung für die Bindung von 53BP1 und reguliert dessen proteosomalen Abbau (Huen, Grant *et al.* 2007, Bohgaki, Bohgaki *et al.* 2013, Hu, Wang *et al.* 2014). Wie zuvor beschrieben und auch in Abbildung 34B bestätigt, wirkt sich die Herunterregulation der Ubiquitin-Ligase RNF8 negativ auf die Rekrutierung von 53BP1 aus und 53BP1 schützt im Komplex mit RIF1 DNA-DSB-Enden vor Resektion in G1 (Escibano-Diaz, Orthwein *et al.* 2013). Daher wurde untersucht, wie sich ein 53BP1 kd auf die Resektion nach Induktion komplexer Schäden auswirkt, um Rückschlüsse auf einen sich möglicherweise gegensätzlich auf die Resektion auswirkenden Effekt eines 53BP1 kd und eines RNF8 kd schließen und so die gewonnenen Ergebnisse in RNF8 kd Zellen besser einschätzen zu können. Hierfür wurden U2OS-Zellen einem siRNA-induzierten 48-stündigen 53BP1 kd unterzogen (vgl. Kapitel 2.1.9 und 2.2.6.1). Die Depletion von 53BP1 wurde mittels Westernblot-Analyse verifiziert (Abbildung 35B), wofür 48 Stunden nach der siRNA-Transfektion Gesamtzelllysate der U2OS-Zellen hergestellt wurden. Nun wurde die Resektion in Form von RPA-Foci nach Immunfluoreszenzfärbung gegen RPA und CENP-F in mock kd und 53BP1 kd Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy alpha-Teilchen zellzyklusabhängig analysiert (vgl. Kapitel 2.2.3.2 und 2.2.4.4). Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Anzahl an RPA-Foci nach 53BP1-Depletion in beiden untersuchten Zellzyklusphasen (Abbildung 35A). Dies bestätigte die vorige Annahme der mutmaßlich gegenläufigen Effekte eines 53BP1 kd und eines RNF8 kd auf die Resektion, sodass sich in Summe nach RNF8 kd keine Differenz der Anzahl an RPA-Foci nach alpha-Teilchen-Bestrahlung nachweisen ließ (vgl. Abbildung 34B).

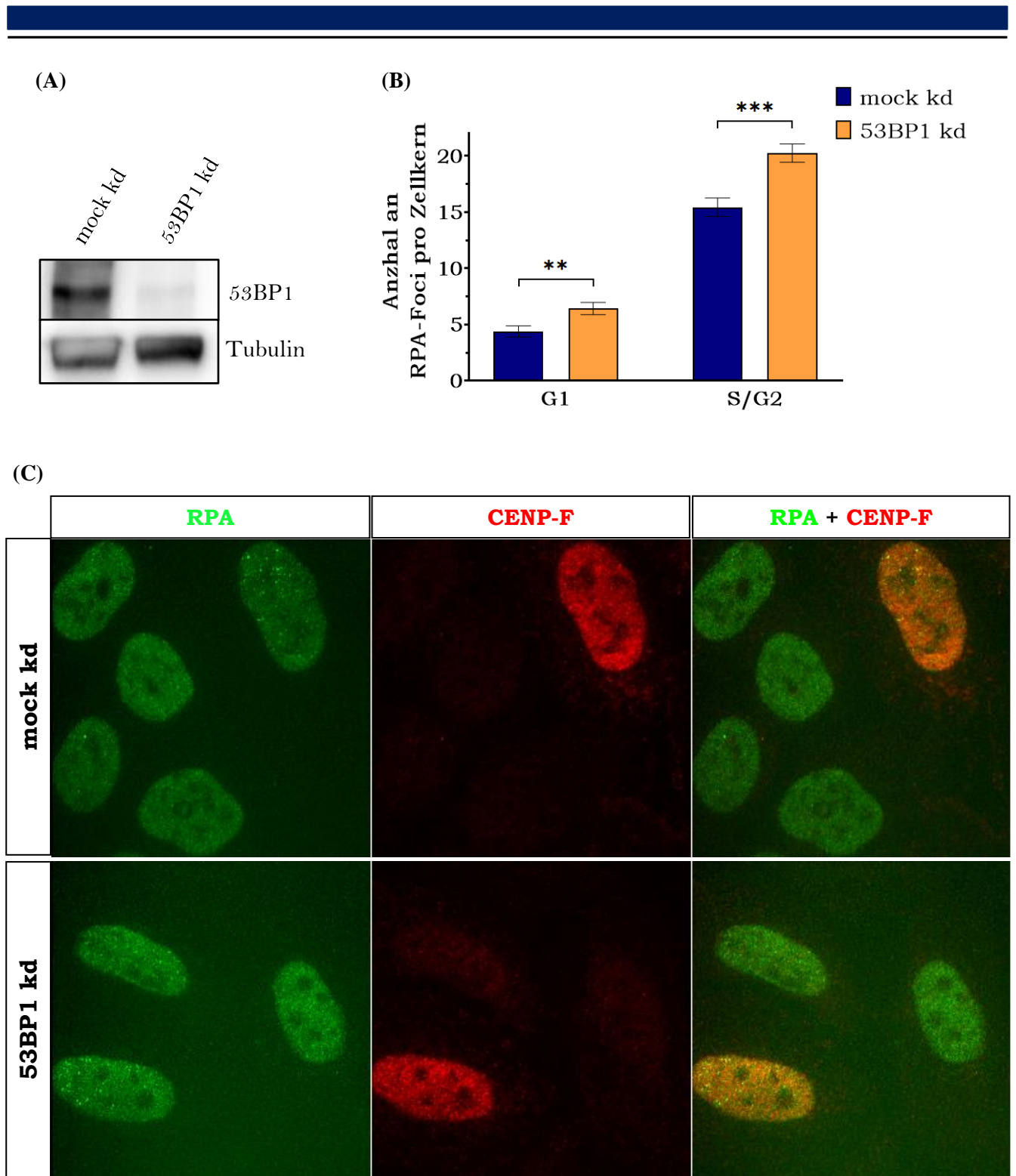


Abbildung 35: Höhere Anzahl an RPA-Foci in beiden Zellzyklusphasen nach 53BP1-Depletion. In humanen Osteosarkomzellen (U2OS-Zellen) wurde 53BP1 mittels spezifischer siRNA (20 nM für 48 h) herunterreguliert und die Zellen anschließend mit 2 Gy alpha-Teilchen (LET: ~150 keV/μm) bestrahlt. 1 h nach Bestrahlung wurden die Proben fixiert und immunhistochemisch gegen RPA und CENP-F gefärbt, wobei CENP-F als Zellzyklusmarker diente. Pro Zellzyklusphase wurden die RPA-Foci von mindestens 50 Zellen ausgewertet (n = 1) (A). Die durchschnittliche Anzahl an RPA-Foci in der jeweiligen Zellzyklusphase der unbestrahlten Probe wurde abgezogen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts (*SEM* = *standard error of the mean*). Die statistische Signifikanz wurde mittels t-test überprüft; (**) = $P < 0,01$; (***) = $P < 0,001$. Die 53BP1-Knockdowneffizienz (20 nM 53BP1 siRNA für 48 h) wurde mittels Westernblot-Analyse überprüft (B). Tubulin diente als Ladekontrolle der aufgetragenen Proteinmenge. Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von RPA-Foci in CENP-F-positiven (S/G2-Phase) und CENP-F-negativen (G1-Phase) mock kd bzw. 53BP1 kd U2OS-Zellen 1 h nach Bestrahlung mit alpha-Teilchen (LET: ~150 keV/μm) (C).

3.3. Relevanz der Ubiquitin-Ligase RNF138 für die DNA-End-Resektion in humanen G1-Phase-Zellen nach Ionenbestrahlung

Zuvor durchgeführte Ubiquitin-Analyse mittels *TUBE-Pulldown* in G1 ließ nach Depletion der Ubiquitin-Ligase RNF8 eine Eindämmung gegenüber des in WT-Zellen beobachteten verstärkten Expressionslevels an ubiquitinierten Proteinen nach Ionenbestrahlung erkennen (Abbildung 33). Aufgrund der mit einem RNF8 kd einhergehenden Herunterregulation von 53BP1 (Abbildung 34A), konnte bei der Analyse der Resektion in Form von RPA-Foci nach alpha-Teilchen-Bestrahlung in RNF8 kd Zellen in Summe keine Veränderung festgestellt werden (Abbildung 34B).

In den Zellzyklusphasen S und G2, in denen DSBs über Homologe Rekombination (HR) repariert werden können, ist die DSB-End-Resektion als Bestandteil der HR ein häufig experimentell näher betrachtetes Phänomen. Auch die posttranslationale Modifikation durch Ubiquitinierung ist Gegenstand der Resektionsregulation. So führt wie zuvor bereits beschrieben die Ubiquitinierung von Ku80 letzten Endes zu dessen proteosomalem Abbau (Feng und Chen 2012). Nach Ismail, Gagne *et al.* (2015) wird die E3 Ubiquitin-Ligase RNF138 als essentieller Faktor beschrieben die Resektion in S/G2 durch das Ablösen Ku80s vom Schaden infolge dessen Ubiquitinierung zu unterstützen. Vor dem Hintergrund, dass frühere Experimente unter anderem in unserer Arbeitsgruppe offenbarten, dass mit steigender Komplexität der induzierten Schäden vermehrt Resektion auch in G1 erfolgt (Averbeck, Ringel *et al.* 2014), wurde im Folgenden die Relevanz der Ubiquitin-Ligase RNF138 für die Regulation der Resektion in G1 nach Induktion komplexer Schäden nach Ionenbestrahlung näher betrachtet.

3.3.1. Vergleichbare Expression von RNF138 in G1- und G2-Phase-Zellen

Nach Ismail, Gagne *et al.* (2015) agiert die Ubiquitin-Ligase RNF138 ausschließlich in S/G2. Daher wurde zu aller erst die zellzyklusspezifische Expression von RNF138 überprüft. Denn dies ist Voraussetzung, um auch in G1-Phase-Zellen fungieren zu können. Zu diesem Zweck wurde eine Westernblot-Analyse der RNF138-Proteinexpression in verschiedenen Zellzyklusphasen durchgeführt. Hierzu wurde wie für alle in dieser Arbeit durchgeführten biochemischen Analysen das in Kapitel 2.1.16 beschriebene Hela.S-Fucci-System verwendet, welches es erlaubt die Zellen anhand Fluoreszenz-gekoppelter Zellzyklusmarker zellzyklusspezifisch zu sortieren (vgl. Kapitel 2.2.7.5) und somit gezielt Zelllysate von ausschließlich G1- oder G2-Phase-Zellen herzustellen, um die Expression verschiedener Proteine zellzyklusabhängig im Westernblot zu untersuchen.

Die Westernblot-Analyse und deren Quantifizierung zeigte, dass RNF138 sowohl in G1- als auch G2-Phase-Zellen vergleichbar stark exprimiert wird (Abbildung 36). Cyclin A dient der Regulation des Zellzyklus, indem es verschiedene Cyclin-anhängige Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, *CDKs*) aktiviert. Sowohl beim Eintritt in die S-Phase als auch beim Übergang von der G2- in die M-Phase spielt Cyclin A eine Rolle und wird daher in diesen Zellzyklusphasen exprimiert, wohingegen es in G1-Phase-Zellen nicht vorhanden ist und sich daher als Zellzyklusmarker, zur Kontrolle des Sortierungsvorgangs, hervorragend eignet (Pagano, Pepperkok *et al.* 1992). Daher wurde neben RNF138 wurde zudem die Proteinexpression von Cyclin A untersucht (Abbildung 36B). Wie in Abbildung 36 ersichtlich, konnte lediglich in G2-Phase-Zellen eine Cyclin A-Expression nachgewiesen werden, was die korrekte Sortierung der Hela.S-Fucci-Zellen in G1- und G2-Phase-Zellen bestätigte. Tubulin

wurde als Ladekontrolle der aufgetragenen Proteinmenge und zur Quantifizierung der Cyclin A- sowie RNF138-Expression mittels ImageJ genutzt.

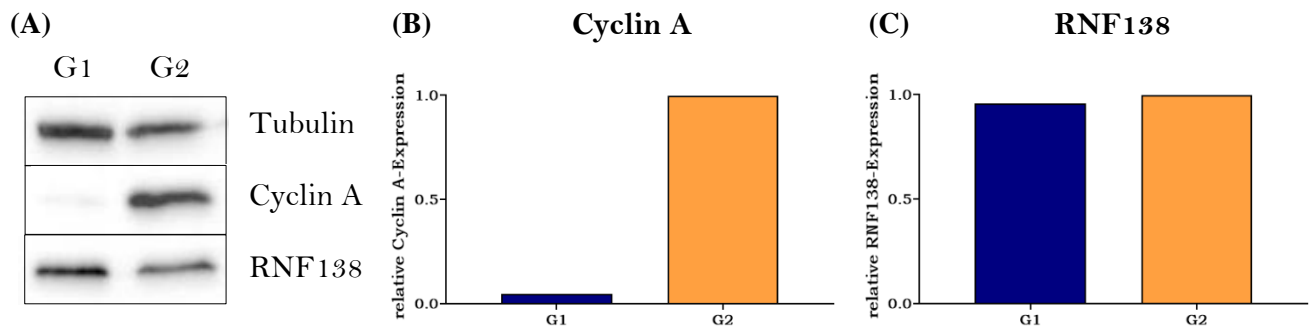


Abbildung 36: RNF138 wird in G1-Phase-Zellen exprimiert. Die Westernblot-Analyse von sortierten HeLa.S-Fucci-Zellen zeigte eine ähnlich starke RNF138-Expression in G1- und S/G2-Phase-Zellen (A). Cyclin A wurde nahezu ausschließlich in G2-Phase-Zellen exprimiert und bestätigte somit die korrekte Sortierung. Tubulin diente als Ladekontrolle der aufgetragenen Proteinmengen. Die quantitativen Analysen (B) und (C) erfolgten mit Hilfe der Software ImageJ. Hierbei wurde jeweils auf die Ladekontrolle Tubulin normiert.

3.3.2. Generierung einer RNF138-KO-Zelllinie zur Untersuchung der Relevanz von RNF138 für die Resektion komplexer DSBs

Nachdem zuvor gezeigt werden konnte, dass RNF138 auch in G1-Phase-Zellen exprimiert wird und daher als möglicher Faktor der Regulation der DSB-Reparatur und der DNA-End-Resektion nach Induktion komplexer Schäden in Frage kommt, wurden mittels CRISPR/Cas9 humane RNF138-*Knockout*- (RNF138-KO) Zelllinien generiert, um die experimentelle Beurteilung der Bedeutung der Ubiquitin-Ligase hierfür zu vereinfachen. Zum einen wurde das humane Gen der E3 Ubiquitin-Ligase RNF138 in bereits zuvor verwendeten U2OS-Zellen für immunhistochemische Analysen ausgeschaltet. Zum anderen wurde für biochemische Untersuchungen auch eine RNF138-defiziente HeLa.S-Fucci-Zelllinie hergestellt. Die genaue Vorgehensweise der Generierung der RNF138-KO-Zelllinien und die Sequenzen der speziell für den RNF138-KO verwendeten Oligonukleotide sind Kapitel 2.1.11 bzw. 2.2.6.9 zu entnehmen. Nachdem sich *Knockout*-Klone beider Zelllinien ausreichend vermehrt hatten, wurden für eine erste Kontrolle des *Knockouts* die Expression von RNF138 in den verschiedenen Klonen mittels einer Westernblot-Analyse untersucht (Abbildung 37).

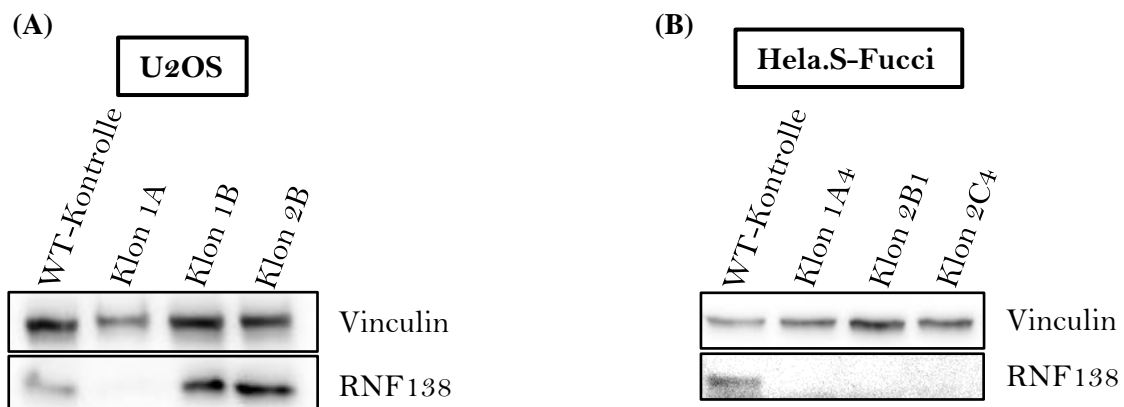


Abbildung 37: U2OS-Klon 1A und HeLa.S-Fucci-Klon 2C4 zeigen quasi keine RNF138-Proteinexpression. Die Westernblot-Analyse von U2OS- (A) und HeLa.S-Fucci-RNF138-KO-Klonen (B) zeigten, dass U2OS-RNF138-KO-Klon 1A und alle untersuchten HeLa.S-Fucci-RNF138-KO-Klone nahezu keine RNF138-Proteinexpression im Westernblot erkennen ließen. Vinculin diente als Ladekontrolle der aufgetragenen Proteinmenge.

Mehrere der untersuchten HeLa.S-Fucci-Klone und ein U2OS-RNF138-KO-Klon zeigten eine deutlich geringere RNF138-Proteinexpression (Abbildung 37).

Für die weitere Charakterisierung wurde aus der genomischen DNA der Zellen der Bereich, in dem die Mutation im RNF138-Gen zu erwarten war, amplifiziert und zur Sequenzanalyse eingeschickt. Bei genauerer Betrachtung der Sequenzierungsergebnisse war festzustellen, dass die Ergebnisse exakt im Bereich der zu erwartenden Mutation uneindeutig wurden und nicht mehr zweifelsfrei einer Base zugeordnet werden konnten (Sequenzierungsergebnisse

Anhang 1 und Anhang 2). Dies bestätigte zunächst, dass die Gensequenz an der gewünschten Stelle verändert und eine Mutation auf dem RNF138-Gen erfolgt war. Die uneindeutige Sequenzanalyse kann jedoch verschiedene Ursachen haben. Möglicherweise sind auf den beiden Allelen unterschiedliche Mutationen im Gen entstanden, wodurch sich die Sequenzen der beiden Allele unterscheiden oder aber es wurde nur ein Allel verändert, wodurch der Mix aus zwei unterschiedlichen Sequenzen entstanden war, was in der Analyse der Sequenz zu keinem eindeutigen Ergebnis führte. Um die Frage der Zygotität zu klären, wurde abschließend eine *in-vitro*-Transkription mit anschließender Cas9-Nuklease-Reaktion durchgeführt. Liegt ein homozygoter *Knockout* vor wurde durch die Mutationen auf beiden Allelen die Cas9-Schnittstelle zerstört und die Nuklease kann das Transkript nicht schneiden, sodass in der Agarosegelanalyse ein unverändertes, großes Produkt zu erwarten ist. Im Fall der WT-Sequenz, bei der die Cas9-Schnittstellen auf beiden Allelen intakt sind, werden hingegen zwei kleinere Fragmente einer Größe entsprechend der Lage der Cas9-Schnittstelle erwartet. Liegt ein heterozygoter *Knockout*, sprich eine Mutation auf nur einem Allel, vor, erwartet man eine Kombination aus beiden – ein großes Fragment des mutierten Allels sowie zwei kleinere Fragmente des unveränderten Alleles mit der intakten Cas9-Schnittstelle. Eine schematische Darstellungen der möglichen Cas9-Nuklease Reaktion sowie die Ergebnisse der Cas9-Nuklease Reaktionen in Form eines Agarosegels sind in Abbildung 38 dargestellt. Ohne jegliche Veränderung, sprich Insertion oder Deletion, war in dem vorliegenden Fall des amplifizierten Transkripts, das den Bereich der zu erwartenden Mutation im RNF138-Gen abdeckte, ein 1364 bp langes Amplifikat zu erwarten. Die zu erwartende Größe der beiden Fragmente nach erfolgter Cas9-Nuklease-Reaktion lag bei einer Länge von 627 bp und 737 bp. Zur Kontrolle wurde die Nuklease-Reaktion auch an einem Amplifikat des jeweiligen WT-Genoms durchgeführt. Dieses ließ sowohl bei den U2OS- als auch den HeLa.S-Fucci-Zellen deutlich zwei Banden der Fragmente in der erwartenden Größe erkennen. Im Fall der untersuchten U2OS-Klone schienen alle drei Klone (1A, 1B und 2A) homozygote RNF138-*Knockout*-Klone zu sein, da nur eine Bande über 1500 bp erkennbar war (Abbildung 38A). Am deutlichsten war das Ergebnis bei Klon 1A ersichtlich, weshalb aus diesem U2OS-RNF138-KO-Klon Zellen vermehrt und diese für alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche als U2OS-RNF138-KO Zelllinie verwendet wurden. Für die RNF138-KO-Klone aus den HeLa.S-Fucci-Zellen war das Ergebnis des Klons 1A3 nicht eindeutig, da im Agarosegel keine definierten Banden zu erkennen waren. Bei Klon 1A4 und 2C4 war eindeutig nur eine Bande kurz unter 1500 bp nachzuweisen, das einen homozygoten *Knockout* in diesen beiden Klonen bestätigte. Klon 2B1 zeigte eine schwache Bande in einem Bereich Größer als 1500 bp, das auf eine Mutation durch Insertion schließen ließ (Abbildung 38B). Zwar waren keine weiteren deutlichen Banden zwischen 700 und 800 bp zu erkennen, jedoch war die Bande über 1500 bp im Vergleich zu den Klonen 1A4 und 2C4 deutlich schwächer, weshalb nach

Betrachtung aller gewonnen Ergebnisse aus Klon 2C4 die HeLa.S-Fucci-RNF138-KO-Zelllinie hochgezogen wurde, die für alle in dieser Arbeit durchgeführten biochemischen Experimente Anwendung fand.

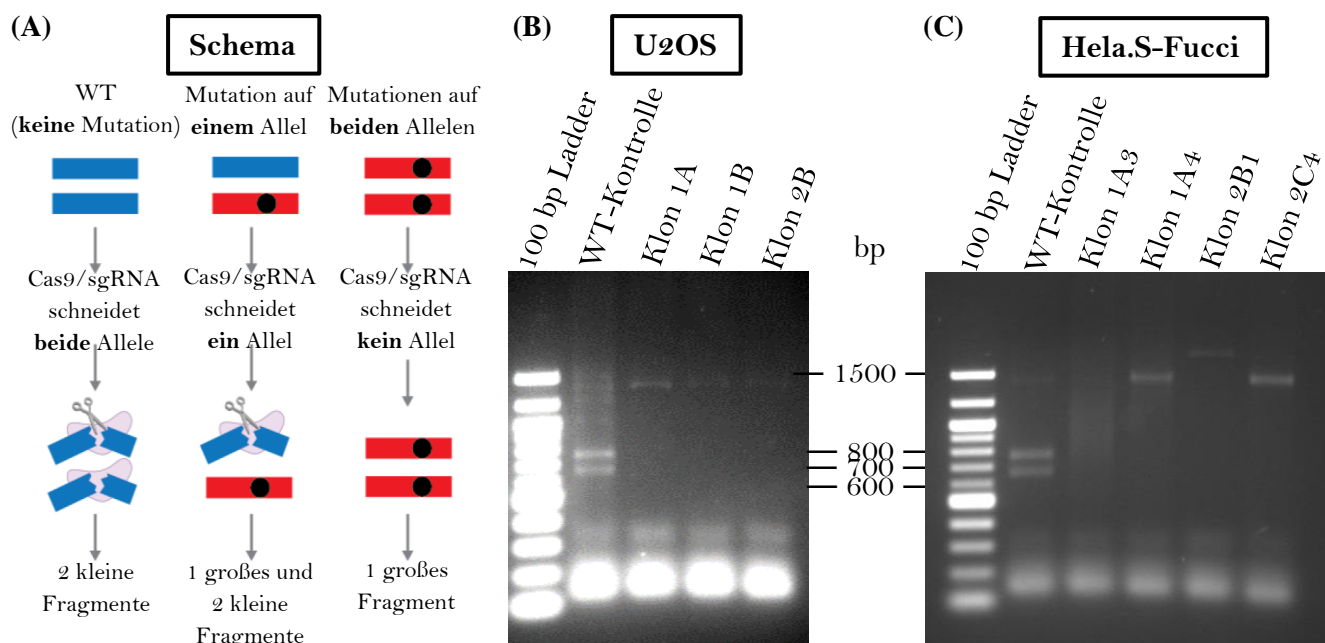


Abbildung 38: Schematische Darstellung der möglichen Cas9-Nuklease-Reaktionen zur Überprüfung der Zygotität (A) und Agarosegelelektrophorese-Ergebnisse der untersuchten U2OS- (B) und HeLa.S-Fucci-RNF138-KO-Klone (C). Während ein großes Fragment in der Agarosegelelektrophorese-Analyse einen homozygoten *Knockout* betätigt, deutet ein großes und zwei kleine Fragmente auf eine Mutation in nur einem Allel hin. Wurde kein Allel mutiert, sind zwei kleine Fragmente ersichtlich (A) (modifiziert nach Guide-it™ Genotype Confirmation Kit Protocol-At-A-Glance von Clontech). Klon 1A in U2OS- und Klon 2C4 sind homozygote RNF138-KO-Klone und wurden folglich in dieser Arbeit als RNF138-defiziente Zelllinien verwendet. Die Agarosegelanalyse nach Cas9-Nuklease-Resktion von verschiedenen RNF138-KO Klonen aus U2OS- (B) und HeLa.S-Fucci-Zellen (C) zeigte mehrere Klone, in denen keine Spaltung des Amplifikats durch Cas9 erfolgen konnte und somit RNF138 auf beiden Allelen (homozygot) ausgeschaltet wurde.

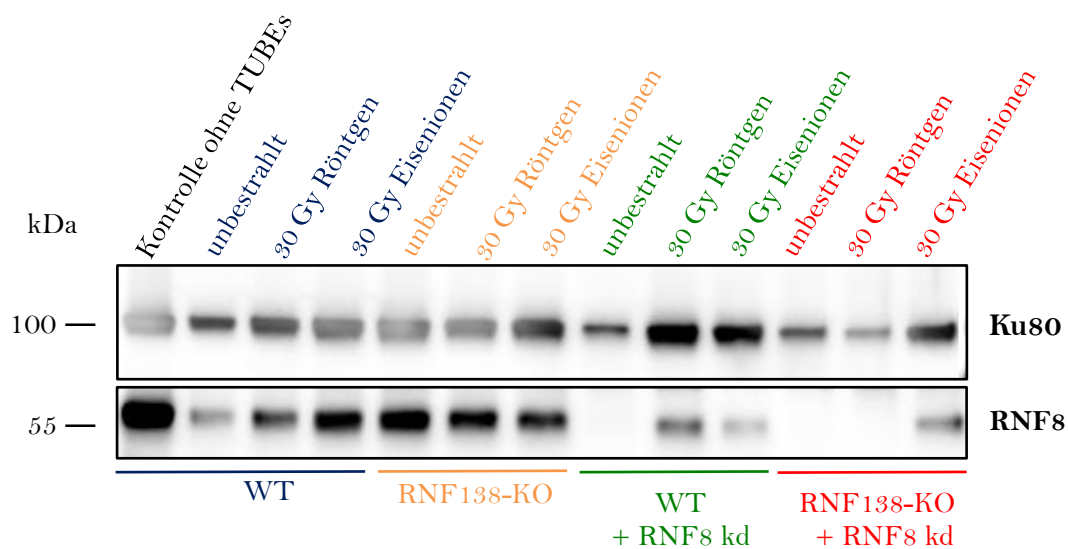
3.3.3. Beeinträchtigte Ubiquitinierung von Proteinen in RNF138-defizienten Zellen insbesondere nach Ionenbestrahlung

Zuvor bereits zeigte sich eine auffallend schwächere Ubiquitinierung nach Depletion der Ubiquitin-Ligase RNF8 1 h nach Bestrahlung mit Eisenionen (Abbildung 33). Wie sich die Defizienz von RNF138 und die simultane Herunterregulation beider Ubiquitin-Ligasen, RNF8 und RNF138, auf die Ubiquitinierung sämtlicher Proteine nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenqualitäten auswirkte, zeigt Abbildung 40. RNF8 wurde mittels 48-stündigem, siRNA-induzierten *Knockdown* herunterreguliert. Die Verifizierung der *Knockdown*-Effizienz und dessen quantitative Analyse sind in Abbildung 39 dargestellt; das Protein Ku80 wurde als Ladekontrolle der aufgetragenen Proteinmenge genutzt. Für dieses Experiment wurde sich einerseits dem HeLa.S-Fucci-System zur Generierung von Zellpellets aus G1-Phase-Zellen und andererseits dem Ubiquitin-*Pulldown* mittels *TUBEs* bedient, mit Hilfe dessen ubiquitinierte Proteine gebunden und über Westernblot analysiert werden können (vgl. Kapitel 2.1.16, 2.2.7.5 und 2.2.7.3). Zur besseren Vergleichbarkeit wurde immer mit einer Millionen G1-Phase-Zellen gearbeitet. Zudem wurde neben den an die Ubiquitin-*Beads* gebundenen Proteinen (*bound*) (Abbildung 40A) eine Probe des für den *Pulldown* eingesetzten Lysats (*input*) mittels

Westernblot untersucht (Abbildung 40B). Dies ermöglichte am Ende über dieses *input*-Signal eventuelle Unterschiede der eingesetzten Proteinmengen ausmachen und durch normieren auf dieses Signal ausmerzen zu können (Abbildung 40C). Abbildung 40 lässt auch in RNF138-defizienten Zellen (orange), wie nach RNF8 kd (grün), eine verminderte durch Ubiquitinierung modifizierter Proteine erkennen. Die Quantifizierung zeigte, dass der Effekt in Zellen, in denen zeitgleich beide Ubiquitin-Ligasen ausgeschaltet wurden (rot), nicht additiv war, sondern sich eher, wie nach Herunterregulation einer der beiden Ubiquitin-Ligasen, dem Level in unbestrahlten Proben anglich. Dass das Level an ubiquitinierten Proteinen lediglich in WT-Zellen strahlungs- und LET-abhängig zunahm, war der Grund, weshalb der Unterschied zwischen WT-Zellen und jenen, in denen eine der beiden oder beide Ubiquitin-Ligasen gleichzeitig ausgeschaltet wurden nach Bestrahlung mit Eisenionen am deutlichsten zu verzeichnen war (Abbildung 40C).

Zusammenfassend konnte festgehalten werden, dass sowohl die E3 Ubiquitin-Ligase RNF138 als auch RNF8 für die strahlungsabhängige Ubiquitinierung wichtig ist.

(A)



(B)

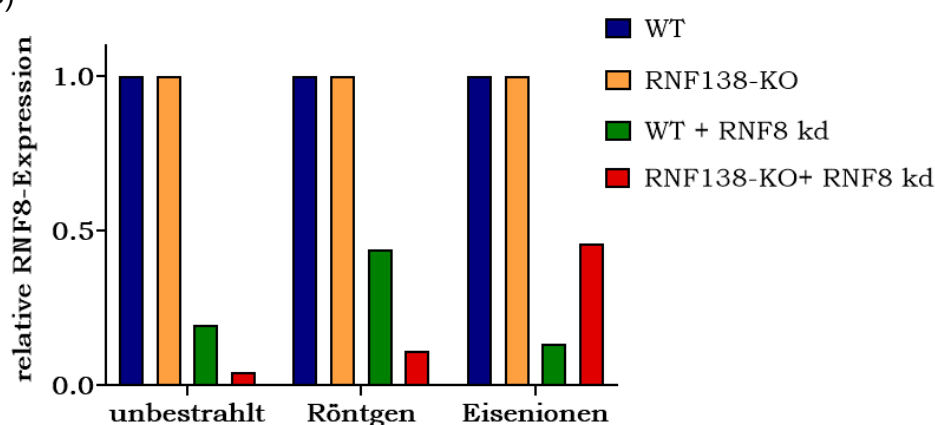


Abbildung 39: Nach 48-stündigem siRNF8 kd ist die Proteinexpression der Ubiquitin-Ligase RNF8 deutlich reduziert. Für die Ubiquitin-Analysen mittels *TUBE-Pulldown* wurden humane Zervixkarzinomzellen einem 48-stündigen siRNA-induzierten RNF8 kd (Hela.S-Fucci-WT + RNF8 kd bzw. Hela.S-Fucci-RNF138-KO + RNF8 kd) unterzogen. Zur Überprüfung der RNF8 *Knockdown*-Effizienz wurden die für den *Pulldown* eingesetzten Lysate (*input*) zudem gegen RNF8 im Westernblot gefärbt (A). In diesem Fall diente das Ku80-*input*-Signal als Ladekontrolle. Dementsprechend wurde das RNF8-Expressionslevel auf das von Ku80 und anschließend auf das der jeweiligen Zelllinie ohne RNF8 kd normiert und quantifiziert (B).

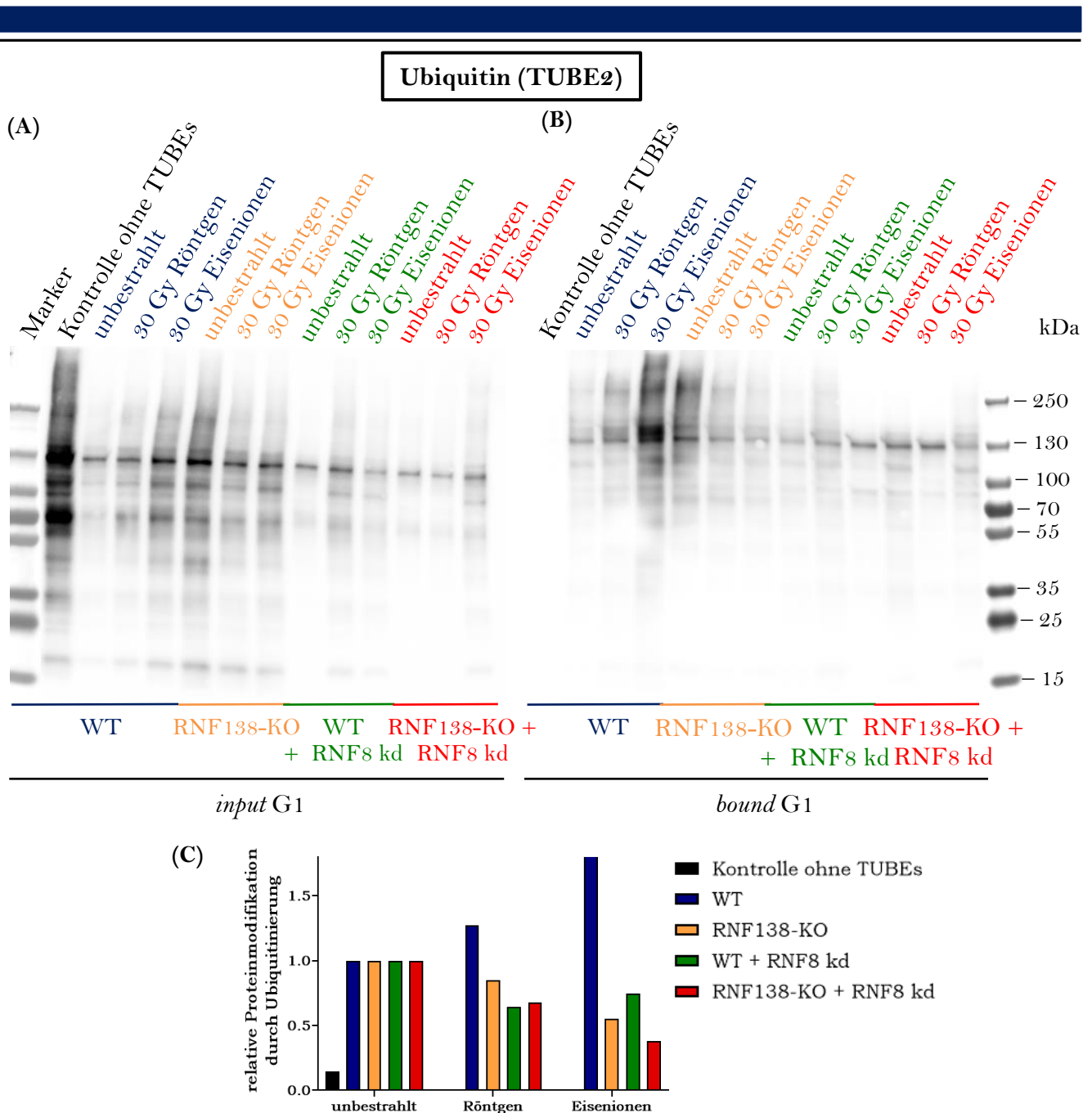


Abbildung 40: Während die Modifikation von Proteinen durch Ubiquitinierung im Fall der WT-Zellen von unbestrahlten über röntgen- bis hin zu eisenbestrahlten Zellen zunimmt, konnte nach Depletion einer der beiden Ubiquitin-Ligasen RNF138 oder RNF8 und Bestrahlung mit Röntgen oder Eisenionen keine verstärkte Ubiquitinierung beobachtet werden. Humane Zervixkarzinomzellen mit stabil integriertem Fucci-System (Hela.S-Fucci-WT), jene, die RNF138-defizient sind (Hela.S-Fucci-RNF138-KO), und die jeweiligen Zelllinien mit zusätzlichem siRNA-induzierten RNF8 kd (Hela.S-Fucci-WT + RNF8 kd bzw. Hela.S-Fucci-RNF138-KO + RNF8 kd) wurden mit 30 Gy Röntgen oder 30 Gy Eisenionen am SIS (Primärenergie: 1 GeV/u; LET: 155 keV/μm) bestrahlt und 1 h nach Bestrahlung am *Cell Sorter* zellzyklusspezifisch sortiert. Zudem wurden unbestrahlte Proben mitgeführt und ebenfalls sortiert. Nun wurden aus je 1 Mio. bestrahlten sowie unbestrahlten G1-Phase WT (blau), RNF138-KO (orange), WT + RNF8 kd (grün) bzw. RNF138-KO + RNF8 kd (rot) Zellen mittels *TUBE* (*Tandem Ubiquitin Binding Entities*) alle ubiquitinierten Proteine gebunden (A). Anschließend konnte folglich alle ubiquitinierten Proteine im Westernblot durch Anfärben mit *TUBE2* analysiert werden (B). Der *Input* beschreibt die Eingangsproteine, die im *Pulldown* eingesetzt wurden, wohingegen die gebundene Fraktion (*bound*) alle ubiquitinierten, *TUBE*-gebundenen Proteine beschreibt. In der Kontrolle wurden *Beads* verwendet, an die keine *TUBE*s gebunden waren, womit die Funktionsfähigkeit des Ubiquitin-*Pulldowns* nachgewiesen werden konnte. Die quantitative Analyse erfolgte mit der Software ImageJ (C). In diesem Fall wurde das *bound*-Level auf den jeweiligen *input* und anschließend die jeweilige unbestrahlte Probe normiert. Die Kontrolle wurde ebenfalls zunächst auf den entsprechende *input* und dann auf die unbestrahlte WT-Probe normiert.

3.3.4. Verminderte Phosphorylierung des DNA-Einzelstrangbindepoteins RPA in RNF138-KO-Zellen nach Bestrahlung mit 30 Gy Röntgen

Um die Bedeutsamkeit von RNF138 für die Resektion zu ermitteln, wurden U2OS-WT und die neu generierten U2OS-RNF138-KO-Zellen mit 30 Gy Röntgen bestrahlt und 1 h nach Bestrahlung Lysate nach Lämmli hergestellt. Mittels Westernblot-Analyse konnte zum einen die Expression von RNF138 in WT- verglichen mit den RNF138-defizienten Zellen verifiziert werden (Abbildung 41A und Abbildung 41B). Zum anderen wurde die Phosphorylierung des Replikationsproteins A (RPA) als Resektionsmarker untersucht. Die quantitative Analyse von RPA in seiner phosphorylierten Variante ließ eine deutliche, über die Hälfte, verringerte Modifikation durch Phosphorylierung des Resektionsmarkers in RNF138-defizienten verglichen zu den WT-Zellen erkennen (Abbildung 41C und Abbildung 41D), das die Funktionalität der generierten RNF138-KO-Zellen bestätigte.

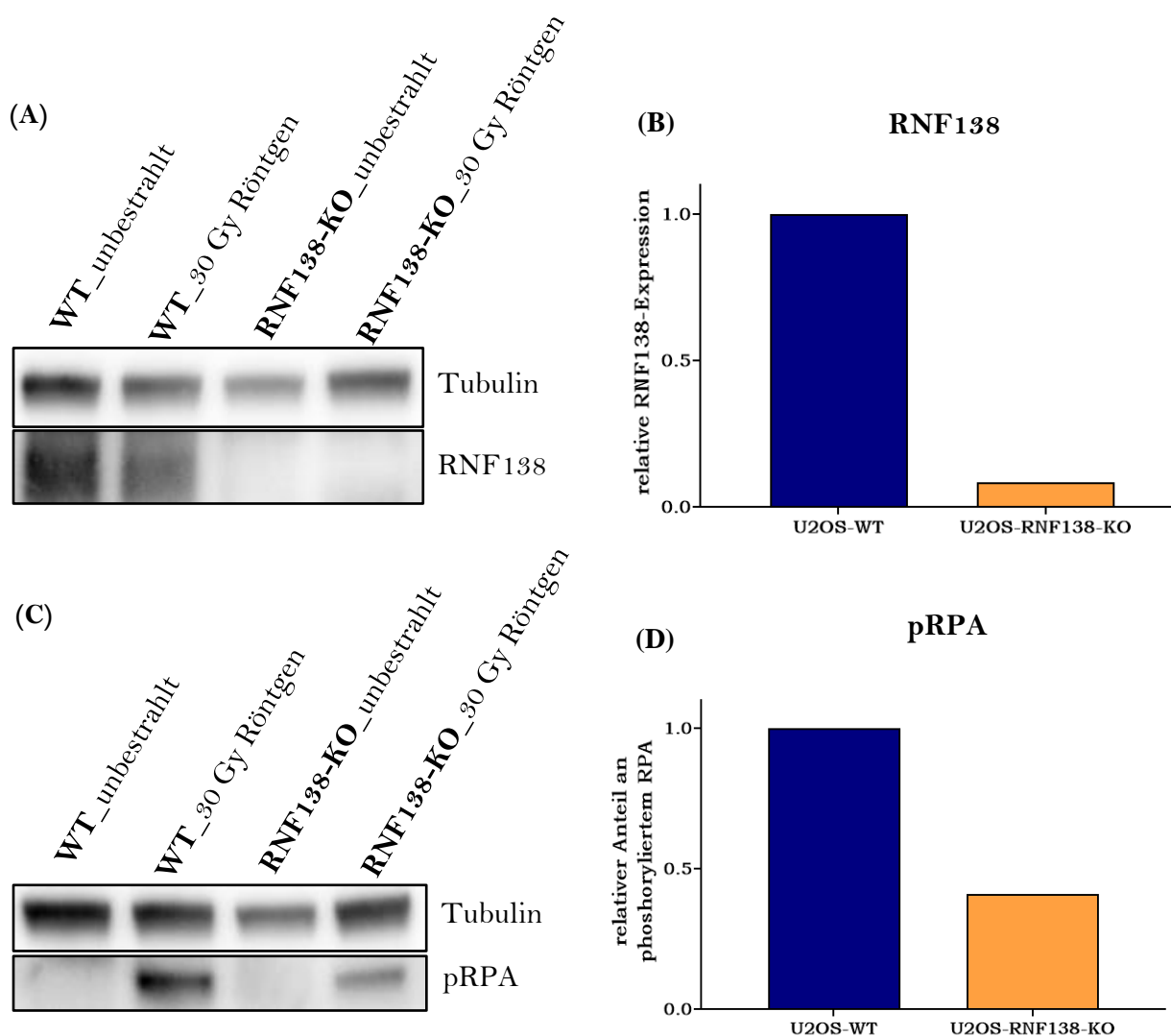
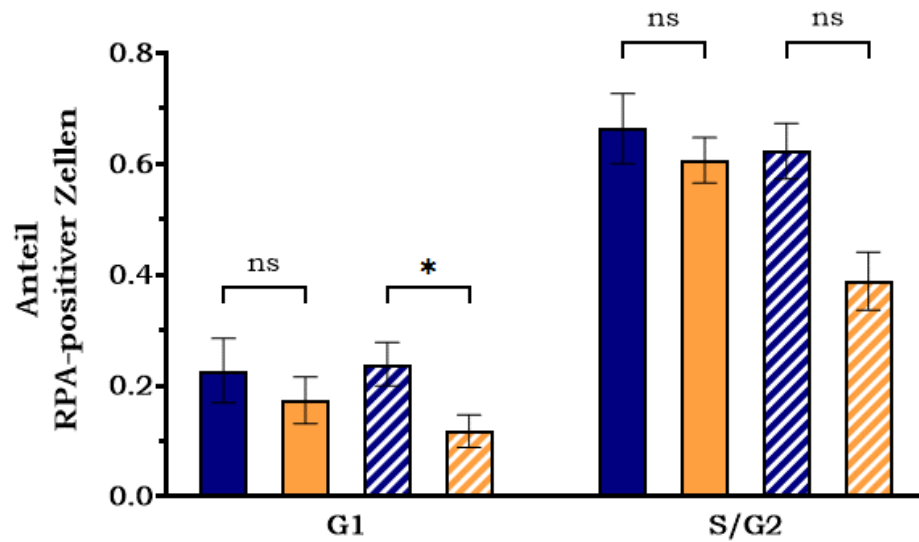


Abbildung 41: In RNF138-KO-Zellen wurde nach Bestrahlung mit 30 Gy Röntgen im Vergleich zu WT-Zellen weniger RPA phosphoryliert. Die Westernblot-Analyse von asynchronen U2OS-WT im Vergleich zu U2OS-RNF138-KO-Zellen bestätigen zum einen, dass RNF138-KO-Zellen kein RNF138 mehr exprimieren (A) und (B) und zum anderen ein verringertes Level an RPA in seiner phosphorylierten Form in RNF138-KO- im Vergleich zu den WT-Zellen (C) und (D) 1 h nach Bestrahlung mit 30 Gy Röntgen. Tubulin diente als Ladekontrolle der aufgetragenen Proteinmengen. Die quantitative Analyse (B) und (D) erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ.

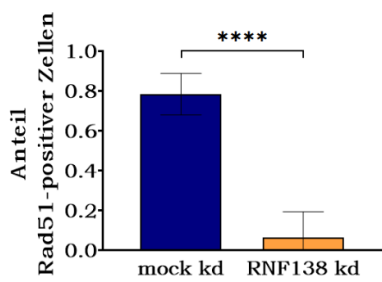
3.3.5. RNF138-Depletion verringert die Anzahl an RPA-positiven Zellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen

Nachdem zuvor gezeigt werden konnte, dass die Phosphorylierung von RPA in RNF138-defizienten, asynchronen U2OS-Zellen nach Bestrahlung mit 30 Gy Röntgen merklich verringert war, wurde nun der Einfluss einer RNF138-Depletion nach Kohlenstoffionenbestrahlung (Fluenz: 5×10^6 T./cm²; Primärenergie: 6,5 MeV/u; LET: 325 keV/μm) zellzyklusabhängig untersucht. Hierfür wurden einerseits die generierten Osteosarkom-U2OS-RNF138-KO- im Vergleich zu U2OS-WT-Zellen verwendet. Andererseits wurden humane Fibroblasten (NFFhTERT-Zellen) als weitere Zelllinie eingesetzt, die einem 48-stündigen siRNA-induzierten RNF138-*Knockdown* unterzogen wurden, um RNF138 herunter zu regulieren (vgl. Kapitel 2.2.6.1). Die Immunfluoreszenzanalyse der RPA-positiven Zellen 1 h nach Bestrahlung in NFFhTERT- und U2OS-Zellen mit Wildtyp-Hintergrund im Vergleich zur RNF138-Depletion zeigte sowohl in CENP-F-negativen G1-Phase- als auch CENP-F-positiven S/G2-Phase-Zellen eine Reduktion der RPA-positiven Zellen in RNF138-depletierten Zellen. In G1-Phase-Zellen führte die Herunterregulation bzw. Ausschaltung von RNF138 zu einer Reduktion der RPA-positiven Zellen um 24% in NFFhTERT und um 50% in U2OS-Zellen. Für S/G2-Phase-Zellen war der Effekt geringer. Hier war in NFFhTERT-Zellen eine Verringerung um nur knapp 10% und in U2OS-Zellen um knapp 38% ersichtlich. Im Gegensatz zu NFFhTERT-Zellen konnten in U2OS-Zellen zwei Datensätze analysiert werden, zudem handelt es sich in U2OS-Zellen um einen kompletten RNF138-*Knockout* wohingegen in NFFhTERT-Zellen RNF138 nur transient mittels siRNA herunterreguliert wurde. Möglicherweise war der Effekt in U2OS-Zellen daher deutlicher und in G1-Zellen signifikant. Dennoch war dieser Trend auch in den NFFhTERT-Zellen zu erkennen (Abbildung 42A). Beispielhafte Immunfluoreszenzaufnahmen sind in Abbildung 42E dargestellt. Die Effizienz des RNF138 kd in NFFhTERT-Zellen wurde anhand der signifikant verringerten Anzahl an Rad51-Foci 4 h nach Bestrahlung in den RNF138-depletierten im Vergleich zu den mock transfizierten Zellen bestätigt (Abbildung 42B). RNF138 als stimulierender Faktor der Resektion in S/G2-Phase-Zellen beeinflusst maßgeblich die DSB-Reparatur über Homologe Rekombination (HR) und demzufolge auch die Rekrutierung von Rad51 an DSBs als wichtiger Faktor der HR (Han, Liang *et al.* 2016, Yard, Reilly *et al.* 2016), weshalb die verminderte Anzahl an Rad51-positiven Zellen in RNF138 kd Zellen als Kontrolle für den erfolgreichen *Knockdown* herangezogen wurde. Zur weiteren Charakterisierung wurde die Zellzyklusverteilung anhand der CENP-F Färbung ermittelt, welche sich in mock kd und RNF138 kd Zellen nicht unterschied (Abbildung 42C). Um zu bestätigen, dass die verschiedenen Proben bei der Schrägbestrahlung am UNILAC gleichermaßen bestrahlt wurden, wurde zusätzlich der Anteil an γH2AX-positiven Zellen in den bestrahlten Bereichen (vgl. Kapitel 2.2.3.3) in mock kd und RNF138 kd Proben verglichen. Auch hier konnte kein Unterschied an γH2AX-positiven Zellen zwischen mock- und siRNF138-transfizierten Zellen ausgemacht werden, wodurch eine gleichmäßige Bestrahlung aller Proben belegt werden konnte (Abbildung 42D).

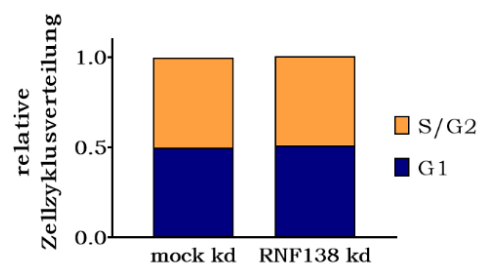
(A) **NFFhTERT mock kd** **U2OS-WT**
NFFhTERT RNF138 kd **U2OS-RNF138-KO**



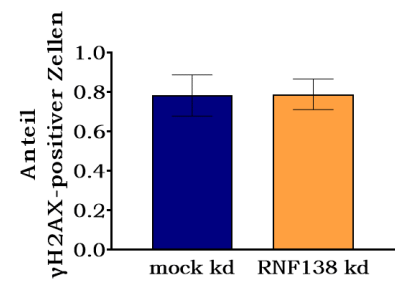
(B)



(C)



(D)



(E)

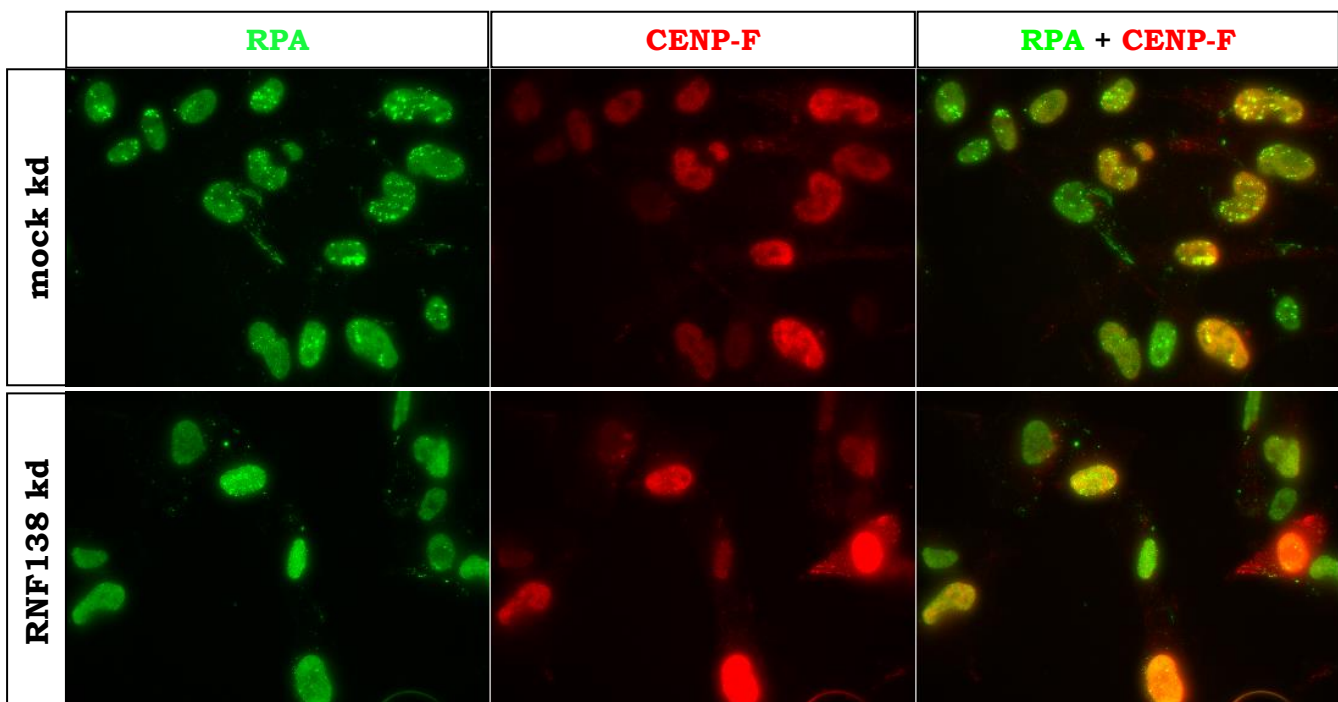


Abbildung 42: Unabhängig der Zellzyklusphase führt die Depletion von RNF138 nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen zu einem geringeren Anteil an RPA-positiven Zellen. Humane, immortalisierte Fibroblasten (NFFhTERT-Zellen), in denen mittels spezifischer RNF138-siRNA die Gen- und folglich Proteinexpression von RNF138 herunterreguliert wurde (RNF138 kd) oder mock-transfizierte (mock kd) Zellen (einfarbig) bzw. humane, Osteosarkom- (U2OS-Zellen) RNF138-*Knockout*- (KO) oder Wildtypzellen (WT) (gestreift) wurden mit 5×10^6 Kohlenstoffionen pro cm^2 (Primärenergie: 6,5 MeV/u; LET: 325 keV/ μm) am UNILAC schräg bestrahlt. 1 h nach Bestrahlung wurden die Proben fixiert und anschließend immunhistochemisch gegen RPA und CENP-F gefärbt, wobei CENP-F als Zellzyklusmarker diente. Es zeigte sich unabhängig der Zellzyklusphase ein verringerter Anteil an RPA-positiven RNF138-depletierten Zellen im Vergleich zu mock kd bzw. WT-Zellen (A). Es wurden Bildfelder in bestrahlten Bereichen gezählt, sodass pro Zellzyklusphase insgesamt mindestens 100 Zellen ausgewertet wurden (NFFhTERT: $n = 1$; U2OS: $n = 2$). Die durchschnittliche Anzahl an RPA-positiven Zellen der jeweiligen Zellzyklusphase der unbestrahlten Probe wurde abgezogen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts ($SEM = \text{standard error of the mean}$). Die statistische Signifikanz wurde mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft; ns = nicht signifikant; (*) = $P < 0,1$. Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von RPA-Foci in CENP-F-positiven (S/G2-Phase) und CENP-F-negativen (G1-Phase) mock kd bzw. RNF138 kd NFFhTERT-Zellen 1 h nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen am UNILAC (Primärenergie: 6,5 MeV/u; LET: 325 keV/ μm) (E). Die RNF138-*Knockdown*-Effizienz wurde durch Zählung der Rad51-positiven Zellen in mock kd im Vergleich zu RNF138 kd-Zellen bestimmt. Es wurden signifikant weniger Rad51-positive Zellen in RNF138-depletierten im Vergleich zu mock-transfizierten Zellen gezählt. Es wurden Bildfelder in bestrahlten Bereichen ausgewertet, sodass insgesamt pro Bedingung mindestens 100 Zellen ausgewertet wurden ($n = 1$). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung ($SD = \text{standard deviation}$). Die statistische Signifikanz wurde mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft; (****) = $P < 0,0001$ (B). Anhand der CENP-F-Färbung konnte gezeigt werden, dass die Zellzyklusverteilung in mock kd und RNF138 kd Zellen vergleichbar ist (C). Zur Verifizierung der gleichmäßigen Schrägbestrahlung in mock kd und RNF138 kd Proben wurden die Zellen zusätzlich gegen γH2AX gefärbt und der Anteil an γH2AX -positiven Zellen in den bestrahlten Bereichen bestimmt. Es wurden Bildfelder in bestrahlten Bereichen gezählt, sodass pro Zellzyklusphase insgesamt mindestens 100 Zellen ausgewertet wurden ($n = 1$). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung ($SD = \text{standard deviation}$) der ausgewerteten Bildfelder (D).

3.3.6. Depletion von UBE2D1 hat lediglich in S/G2-Phase-Zellen und Bestrahlung mit Kohlenstoffionen einen Einfluss auf die Resektion

Abbildung 42 zuvor demonstrierte, dass der *Knockout* von RNF138 in U2OS-Zellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen unabhängig der Zellzyklusphase zu einer signifikant geringeren Anzahl an RPA-positiven Zellen führt und demnach die E3 Ubiquitin-Ligase RNF138 nach Induktion komplexer Schäden auch in G1 die Resektion maßgeblich beeinflusst. Nach Schmidt, Galanty *et al.* (2015) ist in S/G2-Phase-Zellen UBE2D1 das Ubiquitin-konjugierende Enzym, der E2 Bindungspartner, der E3 Ubiquitin-Ligase RNF138, und eine Depletion von UBE2D1 führt nach Camptothecin- (CPT-) Behandlung zu einer geringeren Bildung einzelsträngiger DNA-Bereiche (*ssDNA = single stranded DNA*) und ebenfalls reduzierten Ausbildung von RPA-Foci. Ob UBE2D1 auch in G1-Zellen den E2-Bindungspartner von RNF138 darstellt, wurde mittels RPA-Resektionsanalyse in U2OS-Zellen, die einem 48-stündigen siRNA-induzierten UBE2D1-*Knockdown* (UBE2D1 kd) unterzogen wurden, getestet (vgl. Kapitel 2.1.9 und 2.2.6.1). 1 h nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen (Fluenz: 5×10^6 T./ cm^2 ; Primärenergie: 6,5 MeV/u; LET: 325 keV/ μm) wurde die Anzahl an RPA-positiven Zellen in UBE2D1 kd Zellen bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse wurden simultan mit den zuvor in Abbildung 42 aufgezeigten Resektionsanalysen generiert, weshalb die Vergleichswerte der WT- und RNF138-Zellen den Daten aus Abbildung 42 entsprechen. Während sich die Anzahl an RPA-positiven Zellen in UBE2D1-depletierten S/G2-Phase-Zellen um knapp 28% verringerte, blieb die Anzahl an RPA-positiven G1-

Phase-Zellen unverändert und auf einem vergleichbaren Level mit den WT-Werten (Abbildung 43A). Die UBE2D1-Depletion wurde mittels Westernblot Analyse bestätigt (Abbildung 43B und Abbildung 43C).

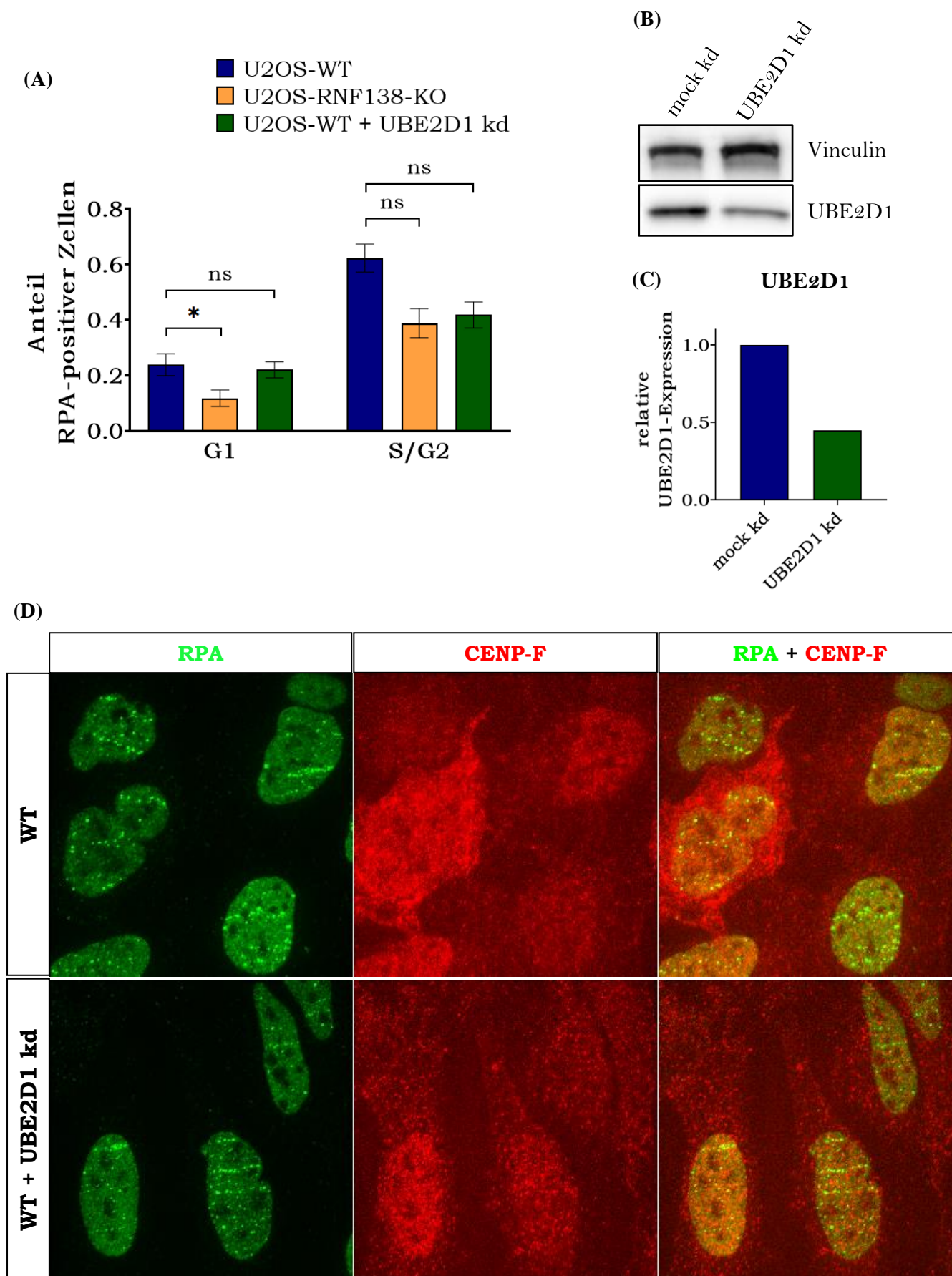


Abbildung 43: Während in S/G2-Phase-Zellen der *Knockdown* von UBE2D1 nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen zu einem geringeren Anteil an RPA-positiven Zellen führt, hat ein UBE2D1 kd in G1-Phase-Zellen keine Auswirkungen auf den Anteil an RPA-positiven Zellen. Humane, Osteosarkom- (U2OS-Zellen) Zellen, in denen UBE2D1 mittels spezifischer siRNA herunterreguliert wurde bzw. RNF138-*Knockout*- (KO) oder unbehandelte Wildtypzellen (WT) wurden mit 5×10^6 Kohlenstoffionen pro cm^2 (Primärenergie: 6,5 MeV/u; LET: 325 keV/ μm) am UNILAC schräg bestrahlt. 1 h nach Bestrahlung wurden die Proben fixiert und anschließend immunhistochemisch gegen RPA und CENP-F gefärbt, wobei CENP-F als Zellzyklusmarker diente. Es wurden Bildfelder in bestrahlten Bereichen gezählt, sodass pro Zellzyklusphase insgesamt mindestens 100 Zellen ausgewertet wurden ($n = 2$). Die durchschnittliche Anzahl an RPA-positiven Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase der unbestrahlten Probe wurde abgezogen. Während in S/G2 der Anteil an RPA-positiven UBE2D1-depletierten im Vergleich zu WT-Zellen verringert war, konnte in G1 kein Unterschied ausgemacht werden (A). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts ($SEM = \text{standard error of the mean}$) der ausgewerteten Bildfelder. Die statistische Signifikanz wurde mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft; ns = nicht signifikant; (*) = $P < 0,1$. Die UBE2D1 *Knockdown*-Effizienz (75 nM UBE2D1 siRNA für 48 h) wurde mittels Westernblot-Analyse überprüft (B). Vinculin diente als Ladekontrolle der aufgetragenen Proteinmenge. Die quantitative Analyse (C) erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ. Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von RPA-Foci in CENP-F-positiven (S/G2-Phase) und CENP-F-negativen (G1-Phase) U2OS-WT bzw. U2OS-WT + UBE2D1 kd Zellen 1 h nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen am UNILAC (Primärenergie: 6,5 MeV/u; LET: 325 keV/ μm) (D).

3.4. Einfluss des Resektionsantagonisten Ku80 – Zielprotein der Ubiquitin-Ligase RNF138 – auf die DNA-End-Resektion nach Induktion komplexer Schäden in G1

In seiner Funktion als Initiator der DSB-Reparatur über NHEJ ist Ku, ein Heterodimer aus Ku70 und Ku80, lange Zeit anerkannt und mehrfach beschrieben (Lieber 2010, Chiruvella, Liang *et al.* 2013). Auch die Wirkungsweise Ku80s extensivere Resektion und HR zu stören wurde beschrieben (Shao, Davis *et al.* 2012, Krasner, Daley *et al.* 2015). Krasner, Daley *et al.* (2015) beschrieben zudem, dass die Extraktion Kus speziell für weitreichendere Resektion durch Exo1 wichtig ist. Nach Postow, Ghenoiu *et al.* (2008) spielt auch hier die posttranslationale Modifikation durch Ubiquitinierung eine Rolle, indem die Ubiquitinierung des Resektionsantagonisten Ku80 ein Mechanismus zur Ablösung Kus vom DNA-Schaden darstellt. In vorherigen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass sich nach Ionenbestrahlung die Defizienz der Ubiquitin-Ligase RNF138 negativ auf die Resektion in beiden Zellzyklusphasen auswirkt. Daher sollte im Folgenden die Möglichkeit eines Einflusses des Resektionsantagonisten Ku80 im Zusammenspiel mit der Ubiquitin-Ligase RNF138 auf die Resektion in G1 nach komplexen Schäden näher untersucht werden.

3.4.1. Entfernung des Resektionsantagonisten Ku80 vom Schaden unabhängig der Präsenz von RNF138 nach Ionenbestrahlung

Die Veröffentlichung von Ismail, Gagne *et al.* (2015) beschreibt die Ubiquitin-Ligase RNF138 als stimulierenden Faktor für die Resektion in S/G2. Ku80 wird RNF138-abhängig ubiquitiniert und folglich vom Schaden abgelöst, was die Resektion fördert. Die direkteste Möglichkeit zu untersuchen, ob Ku80 RNF138-abhängig vom Schaden entfernt wird, war die Immunfluoreszenzfärbung von Ku80 zu etablieren und anschließend Ku80 zu frühen und späteren Zeitpunkten nach Bestrahlung in WT- im Vergleich zu RNF138-defizienten Zellen zu visualisieren. Auf Grundlage des Protokolls von Britton *et al.* konnte die Ku80-Immunfluoreszenzfärbung optimiert werden (vgl. Kapitel 2.2.4.5) (Britton, Coates *et al.* 2013). Nun wurden U2OS-WT- und U2OS-RNF138-KO-Zellen mit Kohlenstoff- (UNILAC: Fluenz: 5×10^6 T./cm²; Primärenergie: 11,4 MeV/u; LET: 168 keV/μm) oder Eisenionen (SIS18: Fluenz 5×10^6 T./cm²; Primärenergie: 1 GeV/u; LET: 155 keV/μm) schräg bestrahlt und 15 min bzw. 1 h nach Bestrahlung nach dem optimierten Protokoll für die Ku80-Immunfluoreszenzanalyse fixiert und gegen Ku80 sowie 53BP1 als Bestrahlungsmarker gefärbt. Sowohl in U2OS-WT als auch RNF138-defizienten U2OS-Zellen war der relative Anteil an Ku80-, 53BP1-positiven Zellen nach Kohlenstoff- als auch Eisenionenbestrahlung 1 h (orange) im Vergleich zu 15 min nach Bestrahlung (blau) signifikant um über 85% verringert (Abbildung 44). Dies deutete auf eine Ablösung Ku80s vom Schaden nach Ionenbestrahlung unabhängig der Präsenz der Ubiquitin-Ligase RNF138 hin.

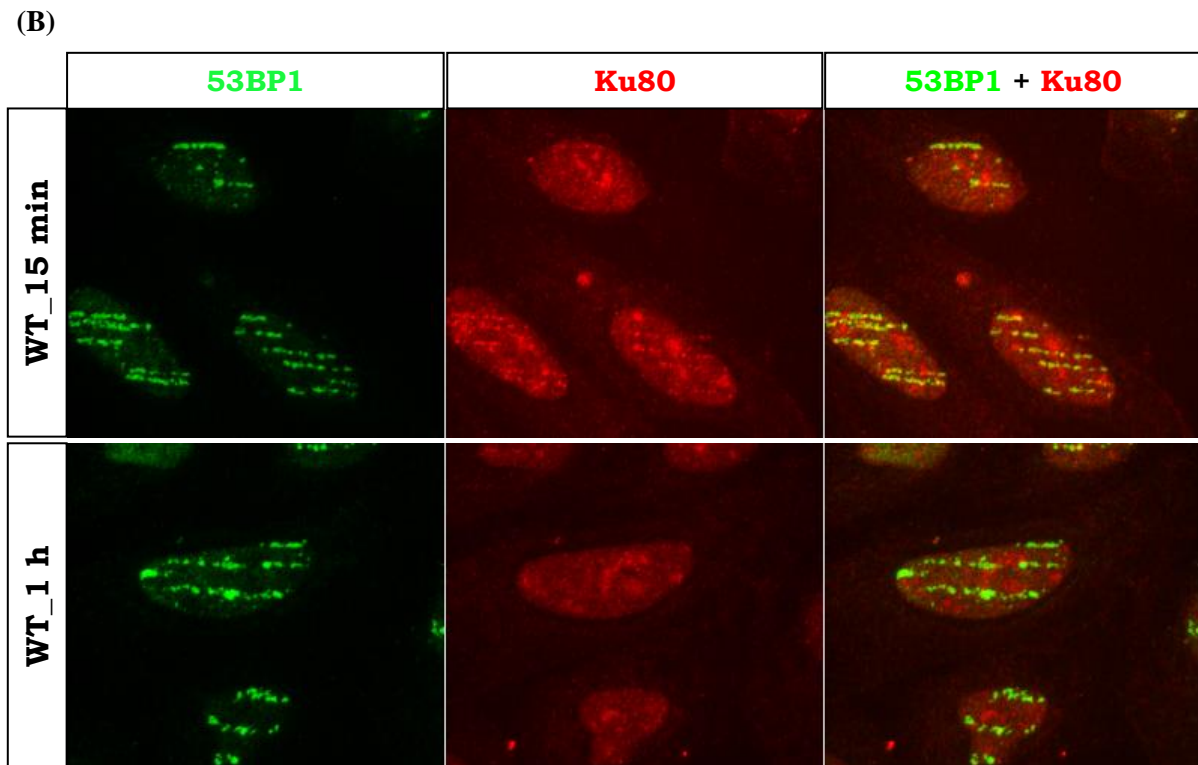
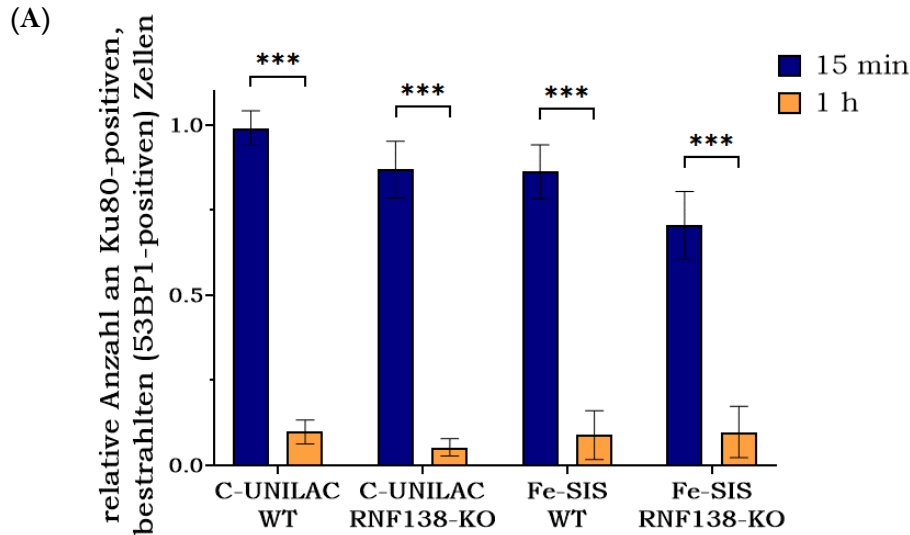


Abbildung 44: Sowohl in WT als auch RNF138-defizienten Zellen sind 1 h nach Bestrahlung mit Kohlenstoff- bzw. Eisenionen signifikant weniger Ku80-positive Zellen auszumachen als 15 min nach Bestrahlung. Humane, Osteosarkom- (U2OS-Zellen) WT- bzw. RNF138-Knockout- (KO) Zellen wurden mit 5×10^6 Kohlenstoffionen pro cm^2 (Primärenergie: 11,4 MeV/u; LET: 168 keV/ μm) am UNILAC oder mit 5×10^6 Eisenionen pro cm^2 (Primärenergie: 1 GeV/u; LET: 155 keV/ μm) am SIS18 schräg bestrahlt. 15 min bzw. 1 h nach Bestrahlung wurden die Proben fixiert und anschließend immunhistochemisch gegen Ku80 und 53BP1 gefärbt, wobei 53BP1 als Bestrahlungsmarker diente. Es wurden Bildfelder gezählt, sodass pro Petrischale insgesamt mindestens 100 Zellen ausgewertet wurden ($n = 1$). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung ($SD = \text{standard deviation}$) der ausgewerteten Bildfelder. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-test bestimmt; (***) = $P < 0,001$ (A). Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von Ku80- und 53BP1-Foci entlang des Ionenstrahls in U2OS-WT-Zellen 15 min und 1 h nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen am UNILAC (Primärenergie: 11,4 MeV/u; LET: 168 keV/ μm) (B).

3.4.2. Auswirkungen einer DNA-PK-Inhibition zu späten Zeitpunkten nach Bestrahlung auf die DNA-DSB-Reparatur ioneninduzierter DSBs

Um die vorherigen Resultate zu verifizieren und die Frage weiter zu verfolgen, ob Ku80 RNF138-unabhängig vom Schaden abgelöst wird und daher nicht die Ursache für eine verminderte Resektion in G1 nach Induktion komplexer Schäden ist, wurde sich einer indirekten Methode bedient, die ebenfalls Aufschluss über den Verbleib oder das Ablösen von Ku80 vom Schaden geben kann. Hierzu wurden U2OS-WT- (Abbildung 45A) und U2OS-RNF138-KO-Zellen (Abbildung 45B) gleichermaßen mit Kohlenstoffionen am UNILAC (Fluenz: 5×10^6 T./cm²; Primärenergie: 11,4 MeV/u; LET: 168 keV/μm) bestrahlt. 15 min, 3 h bzw. 4 h nach Bestrahlung wurden dem Kulturmedium 7,5 μM DNA-PK-Inhibitor (NU7441) (Leahy, Golding *et al.* 2004) zugegeben und alle Proben 10 h nach Bestrahlung fixiert. Zur Kontrolle wurden auch unbehandelte Proben mit Kohlenstoffionen bestrahlt und 15 min, 3 h, 4 h als auch 10 h nach Bestrahlung fixiert. DNA-PK besteht einerseits aus dem Ku-Heterodimer und der katalytischen Untereinheit der DNA-PK (*DNA-PKcs* = *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*) (Smith und Jackson 1999). Die Ku-abhängige Autophosphorylierung der DNA-PKcs ist für die Reparatur von DSBs über NHEJ essentiell (Chan, Chen *et al.* 2002). Demnach könnte die Inhibition der DNA-PK Aufschluss über das Vorhandensein von Ku80 am Schaden geben. Wäre eine beeinträchtigte DSB-Reparatur nach DNA-PK-Inhibition zu verzeichnen, würde dies auf ein Verbleiben von Ku am Schaden hindeuten. Zur Untersuchung der zellzyklusspezifischen DSB-Reparatur strahlungsinduzierter DSBs wurde die etablierte γH2AX-Immunfluoreszenzanalyse verwendet (Rothkamm und Löbrich 2003, Löbrich, Shibata *et al.* 2010). Die durchschnittliche Anzahl an γH2AX-Foci in unbestrahlten Proben wurde abgezogen und die Anzahl an γH2AX-Foci anschließend auf den Maximalwert (100%) 15 min nach Bestrahlung normiert. Nach Zugabe des DNA-PK-Inhibitors 15 min nach Bestrahlung (orange) war bei der Zählung der verbleibenden γH2AX-Foci 10 h nach Bestrahlung in WT als auch in RNF138-KO-Zellen signifikant mehr γH2AX-Foci nachweisbar als in der unbehandelten Kontrolle (blau), was die Wirkungsweise des Inhibitors bestätigte. Die Anzahl an γH2AX-Foci verringerte sich in diesen WT-Zellen von 17,0 Foci 15 min nach Bestrahlung auf durchschnittlich 11,5 Foci 10 h nach Bestrahlung mit DNA-PK-Inhibition im Vergleich zu 5,0 Foci in der unbehandelten Probe. Im Fall der RNF138-KO-Zellen waren anfänglich 16,0 γH2AX-Foci nachzuweisen, wohingegen die Anzahl auf 11,2 Foci 10 h nach Bestrahlung mit DNA-PK-Inhibitor 15 min nach Bestrahlung im Vergleich zu 6,7 Foci ohne Inhibitor sank. Wurde NU7441 3 h oder 4 h nach Bestrahlung zugegeben (grün oder rot), war 10 h nach Bestrahlung weder in WT noch in RNF138-KO-Zellen ein Unterschied der relativen Anzahl an γH2AX-Foci zur jeweiligen unbehandelten Probe ersichtlich. Bei genauerer Betrachtung der unbehandelten Proben fiel jedoch auf, dass sich die relative Anzahl an γH2AX-Foci zwischen 3 h bzw. 4 h und 10 h (WT: 7,4 γH2AX-Foci 3 h nach Bestrahlung auf 5,0 Foci nach 10 h; RNF138-KO 8,2 γH2AX-Foci 3 h nach Bestrahlung– 6,7 Foci nach 10 h) nicht groß unterschied, wodurch in Anbetracht dessen kein entscheidend größerer Effekt durch die Inhibition der DNA-PK hätte erzielt werden können.

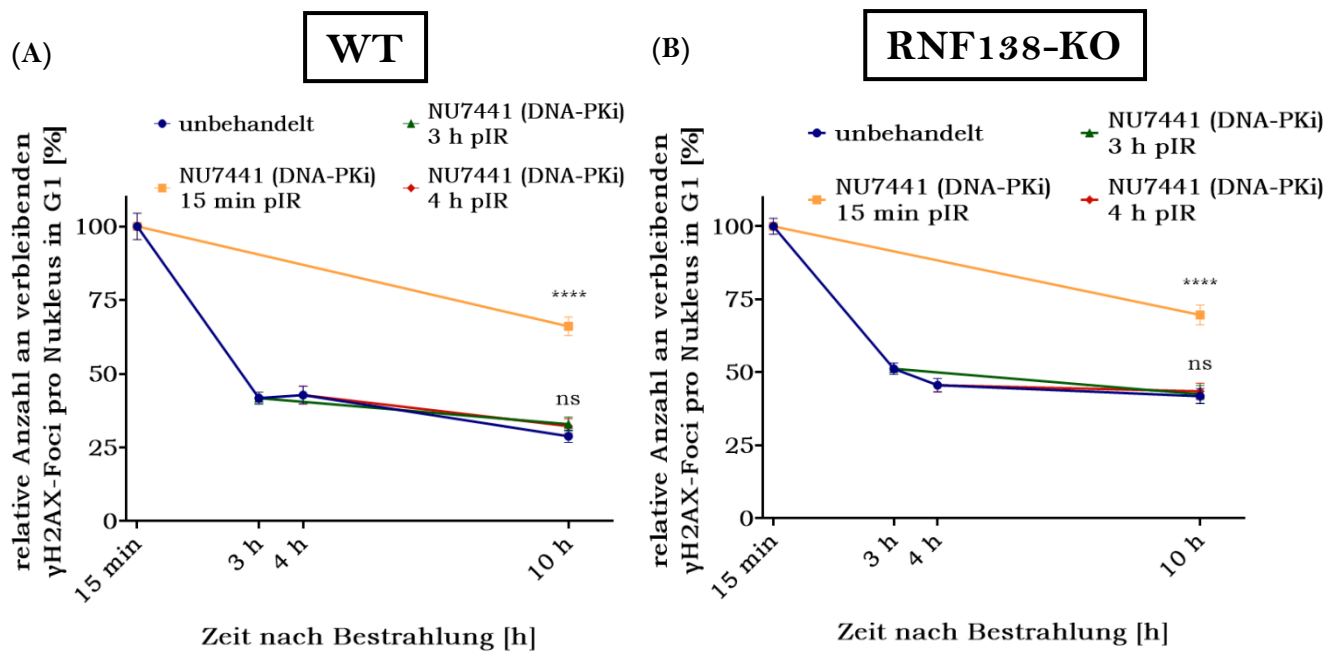


Abbildung 45: Kein DSB-Reparaturdefekt in U2OS-WT- und U2OS-RNF138-KO- G1-Phase-Zellen nach DNA-PK-Inhibition zu späten Zeitpunkten nach Ionenbestrahlung. Humane Osteosarkomzellen (U2OS-WT) (A) bzw. RNF138-defiziente Osteosarkomzellen (U2OS-RNF138-KO) (B) wurden mit 1,35 Gy Kohlenstoffionen (Primärenergie: 11,4 MeV/u; LET: 168 keV/ μ m; Fluenz: 5×10^6 T./cm²) bestrahlt. 3 h bzw. 4 h nach Bestrahlung wurden dem Kulturmedium je 7,5 μ M DNA-PK-Inhibitor (NU7441) zugefügt und die Zellen weiter bis 10 h nach Bestrahlung kultiviert und anschließend fixiert. EdU (10 μ M) wurde direkt nach Bestrahlung dem Kulturmedium zugefügt und diente als Marker von Zellen die während der Reparatur die S-Phase durchlaufen haben bzw. direkten S-Phase-Marker. Nun wurden sie EdU-Click und immunhistochemisch gegen γ H2AX gefärbt und die verbleibende Anzahl an γ H2AX-Foci in mindestens 50 G1-Phase Zellkernen bestimmt ($n = 2$). Die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci in G1 der entsprechenden unbestrahlten Probe wurde abgezogen. Die γ H2AX-Foci Zählungen in unbehandelten WT- bzw. RNF138-KO-Zellen 6 h, 8 h und 10 h nach Bestrahlung sind identisch mit der Reparaturkurve aus Abbildung 55 und wurden zeitgleich durchgeführt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts ($SEM = \text{standard error of the mean}$). Die statistische Signifikanz wurde mittels Varianzanalyse (ANOVA = *analysis of variance*) überprüft; ns = nicht signifikant; (****) = $P < 0,0001$.

3.4.3. Bedeutung der ATPase p97/VCP für die Resektion komplexer Schäden in G1

Die Veröffentlichung von van den Boom, Wolf *et al.* (2016) beschreibt die AAA-ATPase p97 (auch *Valosin-containing protein* (VCP)) als Faktor, der ubiquitiniertes Ku80 vom DSB entfernt, sowohl nach erfolgter c-NHEJ-Reparatur als auch, um Resektion in Vorbereitung auf HR zu fördern. Ob p97/VCP auch speziell in G1 für DSB-Resektion von Belang ist, sollten Resektionsanalysen deutlich machen. Mit diesem Ziel galt es zunächst die effektive Konzentration des p97/VCP-Inhibitors NMS-873 mittels Westernblot zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurden U2OS-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen NMS-873 zwischen 20 μ M und 50 μ M für eine Stunde behandelt, anschließend mit 30 Gy Röntgen bestrahlt und eine weitere Stunde nach Bestrahlung Lysate nach Lämmli angefertigt. Folglich konnte die Phosphorylierung des Resektionsmarkers RPA im Westernblot verdeutlicht werden. 50 μ M NMS-873 erwiesen sich hierbei als ausreichend, um die Proteinmodifikation von RPA durch Phosphorylierung entscheidend zu reduzieren (Abbildung 46) und wurde daher in den nachfolgenden Versuchen als effektive NMS-873-Konzentration zur Inhibition von p97/VCP eingesetzt.

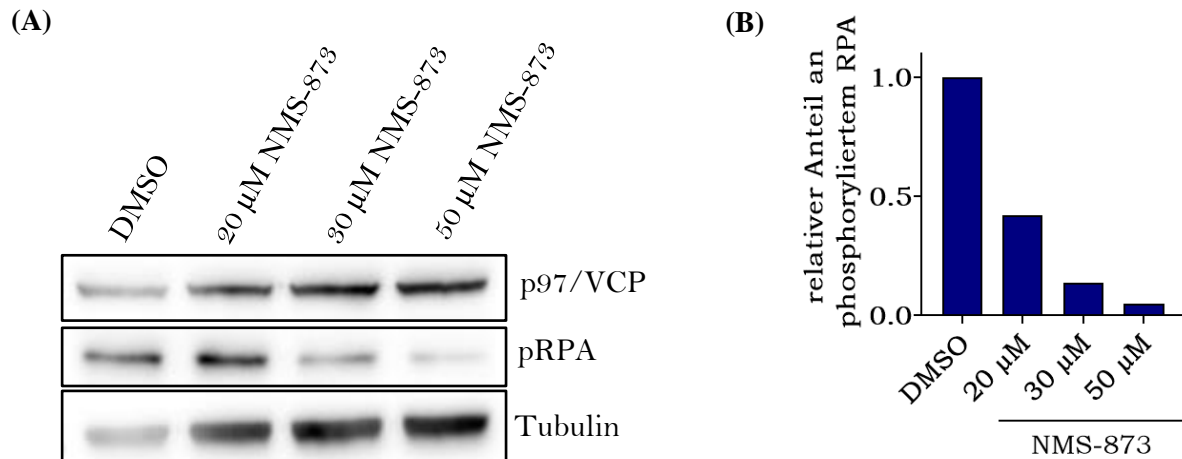


Abbildung 46: Eine Konzentration von 50 μ M NMS-873 erwies sich als effektiv, um das pRPA-Level deutlich zu senken. Die Westernblot-Analyse von U2OS-Zellen zeigten, dass eine Konzentration von 50 μ M NMS-873 in DMSO ausreichend ist, um das pRPA-Level 1 h nach Bestrahlung mit 30 Gy Röntgen deutlich zu senken und so den Einfluss von p97/VCP auf die Resektion untersuchen zu können. Tubulin diente als Ladekontrolle der aufgetragenen Proteinmengen (A). Die quantitative Analyse der Phosphorylierung von RPA normiert auf die Ladekontrolle Tubulin erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ (B).

Demzufolge konnte nun der Einfluss der Inhibition der ATPase p97/VCP auf die Resektion nach Induktion komplexer Schäden zellzyklusabhängig experimentell beurteilt werden. Zur Induktion komplexer Schäden wurden zuvor für eine Stunde mit DMSO bzw. NMS-873-behandelte U2OS-Zellen mit 2 Gy alpha-Teilchen bestrahlt und eine Stunde nach Bestrahlung fixiert (vgl. Kapitel 2.2.3.2). Die Evaluierung der RPA-Foci pro Zellkern nach Immunfluoreszenzfärbung gegen RPA und CENP-F ließ in drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten im Mittel eine reduzierte Anzahl an Resektions-Foci in CENP-F-negativen G1- von 9,3 auf 5,9 RPA-Foci pro Zellkern um 63% und in CENP-F-positiven S/G2-Zellen um 66% von 29,3 auf 19,3 Foci pro Zellkern erkennen, jedoch war dieser Effekt nicht statistisch signifikant (Abbildung 47).

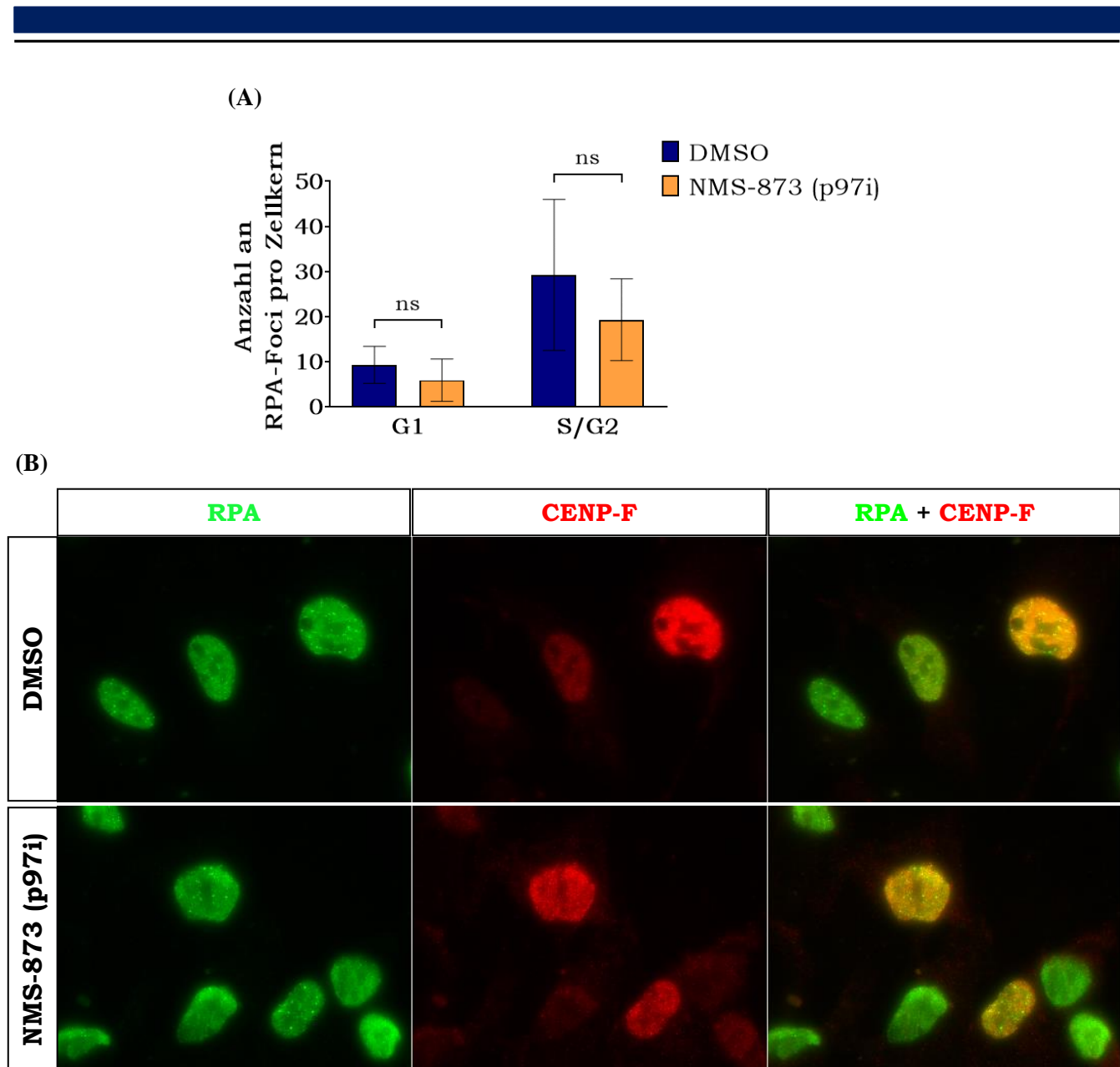


Abbildung 47: Geringere Anzahl an RPA-Foci in beiden Zellzyklusphasen nach Inhibition von p97/VCP. In humanen Osteosarkomzellen (U2OS-Zellen) wurde p97/VCP mittels NMS-873 (50 μ M) inhibiert und die Zellen anschließend mit 2 Gy alpha-Teilchen bestrahlt. 1 h nach Bestrahlung wurden die Proben fixiert und immunhistochemisch gegen RPA und CENP-F gefärbt, wobei CENP-F als Zellzyklusmarker diente. Pro Zellzyklusphase wurden die RPA-Foci von mindestens 50 Zellen ausgewertet ($n = 3$). Die durchschnittliche Anzahl an RPA-Foci in der jeweiligen Zellzyklusphase der unbestrahlten Probe wurde abgezogen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des gewichteten Mittelwerts ($SEM = \text{standard error of the mean}$) aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-test überprüft; ns = nicht signifikant (A). Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von RPA-Foci in CENP-F-positiven (S/G2-Phase) und CENP-F-negativen (G1-Phase) DMSO- bzw. NMS-873-behandelten U2OS-Zellen 1 h nach Bestrahlung mit alpha-Teilchen (LET: $\sim 150 \text{ keV}/\mu\text{m}$) (B).

3.4.4. Interaktion von Ku80 mit der ATPase p97/VCP

Wenn auch nicht statistisch signifikant konnte zuvor ein Effekt nach Inhibition der ATPase p97/VCP auf die Resektion nach Induktion komplexer Schäden durch Bestrahlung mit alpha-Teilchen auch in G1 festgestellt werden. Der Resektionsantagonist Ku80 ist ein Target der Ubiquitin-Ligase RNF138 (Ismail, Gagne *et al.* 2015)

und in seiner ubiquitinierten Form ein Zielprotein der untersuchten ATPase (van den Boom, Wolf *et al.* 2016) und somit ein möglicher Faktor, der die Resektion auch in G1 negativ zu beeinflussen vermag. Um diese Hypothese weiter zu prüfen, wurde die Interaktion von Ku80 mit p97/VCP in G1-Phase-Zellen untersucht. Hierzu wurde eine Ko-Immunpräzipitation sortierter unbestrahlter und mit 30 Gy Röntgen bestrahlter Hela.S-Fucci-WT-Zellen durchgeführt (vgl. Kapitel 2.2.7.3). Zwei oder mehr Schäden innerhalb einer oder zwei helikaler Windungen der DNA werden in der Literatur als komplexe Schäden definiert (Sutherland, Bennett *et al.* 2001, Georgakilas, O'Neill *et al.* 2013). Somit führt auch die Bestrahlung mit einer hohen Dosis an Röntgen, wie hier 30 Gy, zu einer Häufung an DNA-Schäden, die bereits zu einem gewissen Maße als komplex eingestuft werden können (Sutherland, Bennett *et al.* 2002). Ku80 diente in diesem Fall als Antigen, welches gekoppelt an einen Ku80-Antikörper über magnetische *Protein G Beads* mitsamt seinen Interaktionspartnern präzipitiert werden konnte. Über Westernblot war es infolgedessen möglich zu zeigen, dass p97/VCP auch in G1 zu den Interaktionspartnern von Ku80 gehört, jedoch war diese Interaktion nicht strahlungsabhängig (Abbildung 48).

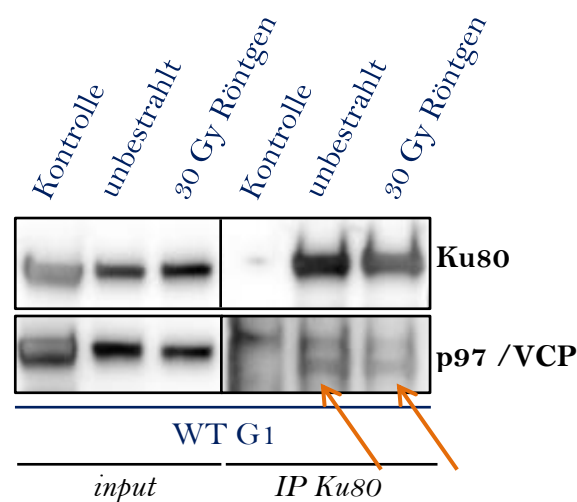


Abbildung 48: P97/VCP interagiert mit Ku80 strahlungsunabhängig in G1-Phase-Zellen. Humane Zervixkarzinomzellen mit stabil integriertem Fucci-System (Hela.S-Fucci-WT) wurden mit 30 Gy Röntgen bestrahlt und 1 h nach Bestrahlung am *Cell Sorter* zellzyklusspezifisch sortiert. Zudem wurden unbestrahlte Proben mitgeführt und ebenfalls sortiert. Nun wurden aus je 1 Mio. bestrahlten sowie unbestrahlten G1-Phase-Zellen mittels *an Protein G Dynabeads* gekoppeltem Ku80-Antikörper Ku80-Proteine und deren Interaktionspartner daran gebunden, sodass anschließend p97/VCP als Interaktionspartner von Ku80 im Westernblot nachgewiesen werden konnte. Der *Input* beschreibt die Eingangsproteine, die in die Immunpräzipitation (IP) eingesetzt wurden, wohingegen *IP Ku80* alle direkt oder über Ku80 an den Ku80-Antikörper gebundenen Proteine ausdrückt. In der Kontrolle wurden *Protein G Dynabeads* mit IgG₁-Isokontrollantikörper verwendet, womit die Spezifität der IP verifiziert werden konnte.

Zur Kontrolle wurden *Protein G Beads* mit einem Kontrollantikörper (Isotypkontrolle), in diesem Fall einem monoklonalen IgG₁ Antikörper der Maus, verwendet. Darüber konnte die unspezifische Bindung des Zielantikörpers, hier Ku80, kontrolliert werden. Für genauere Informationen der verwendeten Antikörper und Isotypkontrolle siehe Kapitel 2.1.7. Neben den Lysaten der schlussendlich präzipitierten Proteine (*IP Ku80*) wurde zudem eine Probe des für die IP eingesetzten Gesamtzelllysats (*input*) auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Kontrolle bestätigte so einerseits, dass keines der im Gesamtlysats enthaltenen Ku80-Proteine an den

Isokontrollantikörper gebunden hatten. Andererseits konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei der oberen Bande des p97/VCP Blots um eine unspezifische Bindung handelte, wohingegen die eigentliche p97/VCP Bande (mit Pfeilen markiert) in der Kontrolle nicht nachzuweisen war, weshalb die Interaktion von Ku80 mit p97/VCP als spezifisch eingeschätzt werden konnte. Dennoch konnte zwischen der unbestrahlten und mit 30 Gy Röntgen bestrahlten Probe kein Unterschied in der Intensität ausgemacht werden, weshalb die Interaktion strahlungsunabhängig vorzuliegen schien (Abbildung 48).

3.4.5. RNF138 und RNF8 als mögliche Faktoren die Proteinmodifikation durch Ubiquitinierung von Ku80 nach Bestrahlung mit Eisenionen zu beeinflussen

Posttranslationale Modifikationen von DSB-Reparaturfaktoren sind unter anderem für die Rekrutierung als auch den Abbau dieser wichtig. Wie bereits zuvor erwähnt, sind nach Ismail, Gagne *et al.* (2015) die beiden Ubiquitin-Ligasen RNF8 in G1 und RNF138 in S/G2 für die Ubiquitinierung von Ku80 bedeutend. Mittels Ubiquitin-*TUBE-Pulldown* sollte nun evaluiert werden, ob eine der beiden oder eventuell beide Ubiquitin-Ligasen zusammen an der Ubiquitinierung von Ku80 in G1 nach Induktion komplexer DSBs durch Bestrahlung mit Eisenionen beteiligt sind, was dann zum Ablösen Ku80s vom Schaden führt. Dazu wurden Hela.S-Fucci-WT und RNF138-defiziente Hela.S-Fucci-Zellen 48 h einem siRNF8-induzierten *Knockdown* unterzogen (vgl. Kapitel 2.2.6.1). Zudem wurden jene Zelllinien ohne zusätzlichen RNF8 kd untersucht. Der RNF8 kd wurde mittels Westernblot-Analyse zuvor verifiziert, wobei Ku80 als Ladekontrolle diente (Abbildung 39A). Zur Quantifizierung der *Knockdown*-Effizienz wurden alle Signale zunächst auf Ku80 als Ladekontrolle und anschließend die Bandenintensität der RNF8-depletierten Probe auf das Signal der jeweiligen Kontrollzelllinie (WT bzw. RNF138-KO) normiert (Abbildung 39B). Für die Ubiquitinanalyse wurden die Zellen mit 30 Gy Röntgen bzw. 30 Gy Eisenionen (SIS18: Primärenergie: 1 GeV/u; LET: 155 keV/μm) bestrahlt, 1 h nach Bestrahlung sortiert und Zellpellets aus einer Millionen G1-Phase-Zellen generiert, deren Lysate anschließend für den Ubiquitin-*Pulldown* eingesetzt werden konnten. Zudem wurden unbestrahlte Proben aller Zelllinien mitgeführt. Mittels *Beads* ohne gebundene *TUBEs* konnte die Funktionsfähigkeit des Assays bestätigt werden. Für die spätere Quantifizierung wurde auch in diesem Fall neben den an die Ubiquitin-*Beads* gebundenen Proteinen (*bound*) immer eine Probe des für den *Pulldown* verwendeten Lysats (*input*) auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abbildung 49A). Somit konnte das *bound*-Signal am Ende auf das *input*-Signal und anschließend die jeweilige unbestrahlte Probe normiert werden, um eine bessere Aussage treffen zu können (Abbildung 49B). Diese Analyse zeigte eine strahlungs- und LET-abhängige steigende Modifikation durch Ubiquitinierung von Ku80 in WT-Zellen (blau). Für die RNF138-defizienten Zellen war nach Röntgenbestrahlung ebenfalls eine vermehrte Ku80-Proteinmodifikation durch Ubiquitinierung zu verzeichnen, wohingegen das Level nach Bestrahlung mit Eisenionen vergleichbar mit dem der unbestrahlten Kontrolle (orange) war. Nach RNF8 Depelton war bereits in WT-Zellen kein Anstieg, vielmehr eine kleine Reduktion an ubiquitiniertem Ku80 zu erkennen (grün), das sich durch Ausschaltung der RNF8-Ligase in den bereits RNF138-defizienten Zellen noch zu verstärken schien (rot) (Abbildung 49B).

Möglicherweise sind also beide Ubiquitin-Ligasen, RNF8 und RNF138, in der Lage Ku80 zu ubiquitinieren und erst die simultane Ausschaltung beider reduziert das Level an ubiquitiniertem Ku80 entscheidend.

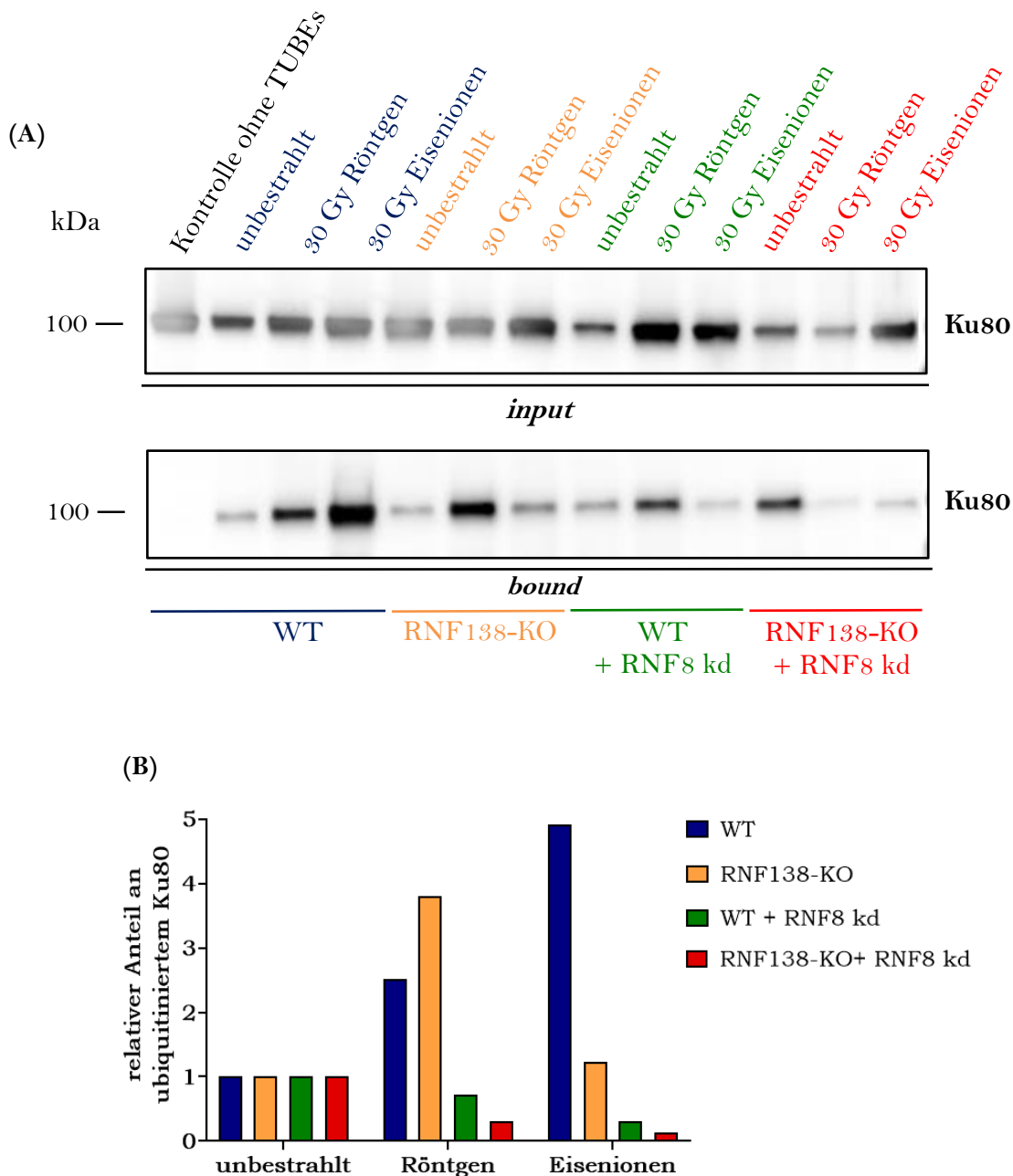


Abbildung 49: In WT- und RNF138-KO-G1-Phase-Zellen nahm die Ubiquitinierung von Ku80 nach Bestrahlung mit Röntgen zu, wohingegen die Proteinmodifikation in RNF8-depletierten G1-Phase-Zellen eher abnahm. Humane Zervixkarzinomzellen mit stabil integriertem Fucci-System (Hela.S-Fucci-WT), jene, die RNF138-defizient sind (Hela.S-Fucci-RNF138-KO), und die jeweiligen Zelllinien mit zusätzlichem siRNA-induzierten RNF8 kd (Hela.S-Fucci-WT + RNF8 kd bzw. Hela.S-Fucci-RNF138-KO + RNF8 kd) wurden mit 30 Gy Röntgen oder 30 Gy Eisenionen am SIS (Primärenergie: 1 GeV/u; LET: 155 keV/μm) bestrahlt und 1 h nach Bestrahlung am *Cell Sorter* zellzyklusspezifisch sortiert. Zudem wurden unbestrahlte Proben mitgeführt und ebenfalls sortiert. Nun wurden aus je 1 Mio. bestrahlten sowie unbestrahlten G1-Phase WT- (blau), RNF138-KO- (orange), WT + RNF8 kd (grün) bzw. RNF138-KO + RNF8 kd (rot) Zellen mittels *TUBE* (*Tandem Ubiquitin Binding Entities*) alle ubiquitinierten Proteine gebunden. Anschließend konnte folglich ubiquitiniertes Ku80 im Westernblot analysiert werden (A). Der *Input* beschreibt die Eingangsproteine, die im *Pulldown* eingesetzt wurden, wohingegen die gebundene Fraktion (*bound*) alle ubiquitinierten, *TUBE*-gebundenen Proteine beschreibt. In der Kontrolle wurden *Beads* verwendet, an die keine *TUBEs* gebunden waren, womit die Funktionsfähigkeit des Ubiquitin-*Pulldowns* nachgewiesen werden konnte. Die quantitative Analyse erfolgte mit der Software ImageJ (B). In diesem Fall wurde das Level an durch Ubiquitinierung modifiziertem Ku80 auf den jeweiligen *input* an Ku80 und anschließend die unbestrahlte WT Probe normiert.

3.5. Beitrag des RNF138-Target CtIP an der Resektionsregulation in G1 nach Ionenbestrahlung

Die Relevanz der Ubiquitin-Ligase RNF138 für die Resektion wurde in Kapitel 3.3. analysiert und dargestellt. Allein die Ausschaltung von RNF138 war ausreichend, um die Resektion nach Ionenbestrahlung erheblich zu schmälern (vgl. Abbildung 42 in Kapitel 3.3.5). Analysen der Wirkungsweise von RNF138 über dessen Zielprotein, den Resektionsantagonisten Ku80, auf die DNA-End-Prozessierung im Kapitel 3.4. zuvor ließen jedoch erkennen, dass die Ausschaltung der Ubiquitin-Ligase RNF138 alleine nicht ausreichend war, um das Ablösen Ku80s vom Schaden fundamental zu beeinflussen und so die Resektion zu beeinträchtigen. Schmidt, Galanty *et al.* (2015) beschreiben den Resektionsfaktor CtIP als weiteres Target von RNF138. CtIP (*C-terminal binding protein 1 interacting protein*) interagiert mit dem MRN Komplex (Mre11-Rad50-Nbs1-Komplex) und ist so als wichtiger Faktor der Resektion in S/G2 bekannt (Sartori, Lukas *et al.* 2007, Huertas und Jackson 2009). Auerbeck, Ringel *et al.* (2014) zeigten im Zusammenhang mit einem LET-abhängigem vermehrten Auftreten von Resektion in G1, dass CtIP auch hierbei eine wichtige Rolle spielt. Die Ubiquitin-Ligase RNF138 wird als wichtiger Faktor beschrieben CtIP in S/G2 zu ubiquitinieren und folglich dessen Rekrutierung an DSBs zu ermöglichen (Schmidt, Galanty *et al.* 2015). Eine gehemmte Rekrutierung des Resektionsfaktors CtIP würde sich ebenfalls negativ auf die Resektion auswirken und die Wirkungsweise der Ubiquitin-Ligase RNF138 näher charakterisieren, weshalb diese Möglichkeit im Folgenden näher untersucht werden sollte.

3.5.1. Verminderte Rekrutierung des Resektionsfaktors CtIP an komplexe DSBs in RNF138-depletierten Zellen

Mit dem Ziel die Wirkungsweise von RNF138 auf CtIP näher zu untersuchen, sollte nun getestet werden, wie sich eine Defizienz der Ubiquitin-Ligase auf die Rekrutierung des Resektionsfaktors nach Induktion komplexer Schäden durch Ionenbestrahlung auswirkt. Zu diesem Zweck wurde einerseits in NFFhTERT-Zellen RNF138 mittels siRNA für 48 h herunterreguliert und die Zellen anschließend mit Kohlenstoffionen (Fluenz: 5×10^6 T./cm²; Primärenergie: 6,5 MeV/u; LET: 325 keV/μm) schräg bestrahlt (Abbildung 50A). Die Effizienz des *Knockdowns* wurde bereits zuvor anhand der verringerten Anzahl an Rad51-positiven Zellen in RNF138-depletierten Proben nachgewiesen (siehe Abbildung 42). Andererseits wurden die generierten U2OS-RNF138-KO- im Vergleich zu U2OS-WT-Zellen verwendet, diese transient für 24 h mit mCherry-getagtem CtIP transfiziert und daraufhin mit 5×10^6 Eisenionen pro cm² mit einem LET von 2875 keV/μm bei einer Primärenergie von 11,4 MeV/u am UNILAC schräg bestrahlt (Abbildung 50B). Fixiert wurde jeweils 30 min nach Bestrahlung. Daraufhin erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung gegen CtIP und Geminin bzw. CENP-F als Zellzyklusmarker und die mikroskopische Auswertung. Diese ergab eine signifikante Reduktion des relativen Anteils an CtIP-positiven Zellen in allen untersuchten Zellzyklusphasen sowohl nach Kohlenstoff- als auch Eisenionenbestrahlung (Abbildung 50A und Abbildung 50B). Abbildung 50C zeigt repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von CtIP-Foci in mock kd und RNF138 kd NFFhTERT-Zellen 30 min nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen (Fluenz: 5×10^6 T./cm²; Primärenergie: 6,5 MeV/u; LET: 325 keV/μm).

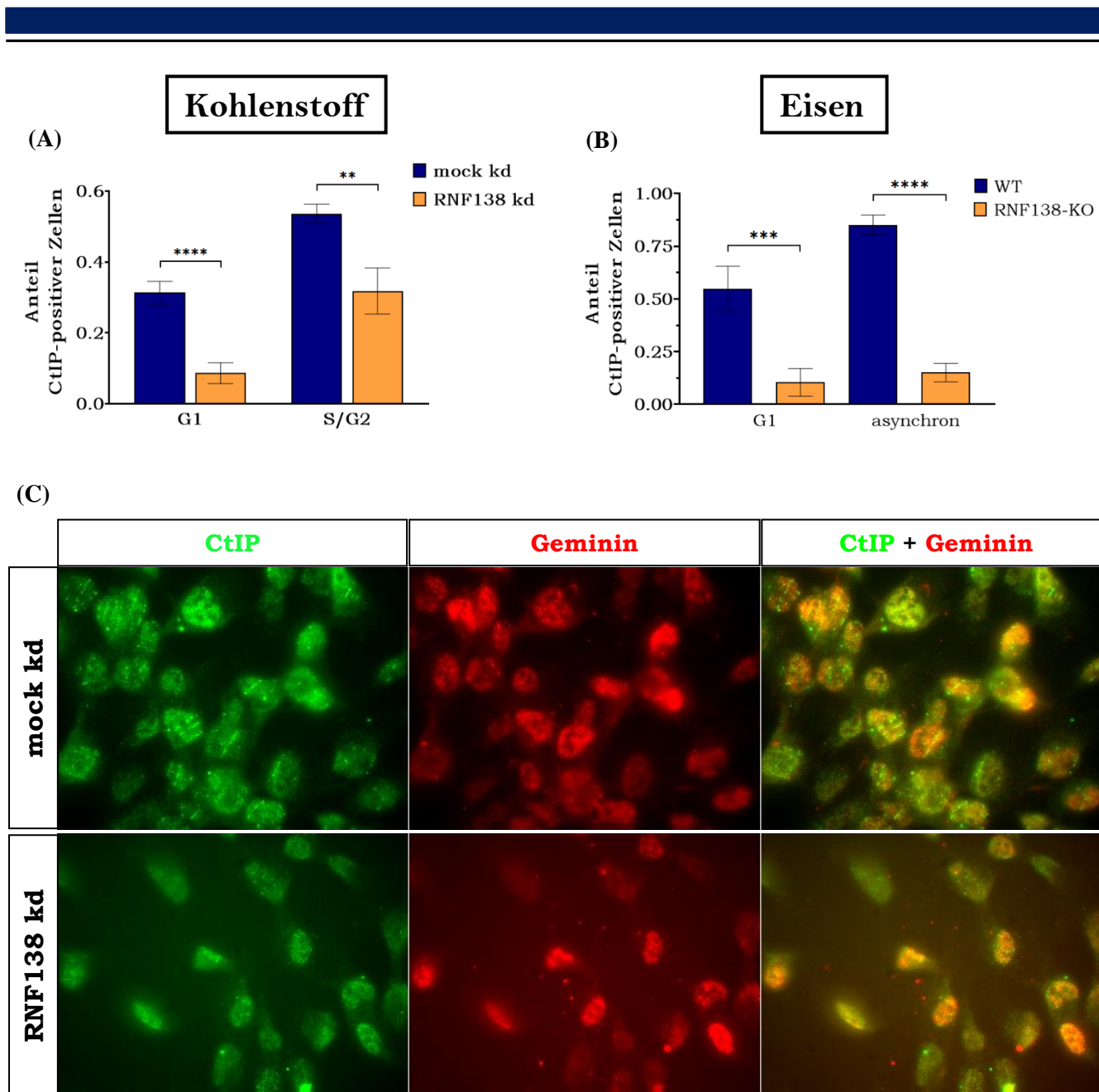


Abbildung 50: Die Herunterregulation von RNF138 nach Ionenbestrahlung führt in beiden Zellzyklusphasen zu einem geringeren Anteil CtIP-positiver Zellen. Humane, immortalisierten Fibroblasten (NFFhTERT-Zellen), in denen mittels spezifischer RNF138-siRNA die Gen- und folglich Proteinexpression von RNF138 herunterreguliert wurde (RNF138 kd) oder mock transfizierte (mock kd) Zellen wurden mit 5×10^6 Kohlenstoffionen pro cm^2 (Primärenergie: 6,5 MeV/u; LET: 325 keV/ μm) am UNILAC schräg bestrahlt und 30 min nach Bestrahlung fixiert (A). Humane Osteosarkomzellen (U2OS-Zellen) und RNF138-defiziente Zellen (U2OS-RNF138-KO) wurden transient mit CtIP-mCherry transfiziert, 24 h später am UNILAC mit Eisenionen (Primärenergie: 11,4 MeV/u; LET: 2875 keV/ μm) schräg bestrahlt und ebenfalls 30 min nach Bestrahlung fixiert (B). Anschließend wurden die Zellen immunhistochemisch gegen CtIP und CENP-F bzw. Geminin gefärbt, wobei CENP-F und Geminin als Zellzyklusmarker dienten. Es wurden Bildfelder mikroskopisch in bestrahlten Bereichen ausgewertet, sodass pro Zellzyklusphase insgesamt mindestens 100 Zellen gezählt wurden. Die durchschnittliche Anzahl an CtIP-positiven Zellen der jeweiligen Zellzyklusphase der unbestrahlten Probe wurde abgezogen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts ($SEM = \text{standard error of the mean}$) der ausgewerteten Bildfelder. Die statistische Signifikanz wurde mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test bestimmt; (**) = $P < 0,01$; (***) = $P < 0,001$; (****) = $P < 0,0001$. Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von CtIP-Foci in Geminin-positiven (S/G2-Phase) und Geminin-negativen (G1-Phase) mock kd bzw. RNF138 kd NFFhTERT-Zellen 30 min nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen am UNILAC (Fluenz: $5 \times 10^6 \text{ T./cm}^2$; Primärenergie: 6,5 MeV/u; LET: 325 keV/ μm) (C).

Infolge von Laserbestrahlung treten sowohl oxidative Basenschäden als auch Einzelstrangbrüche (SSBs) und DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) auf (Lan, Nakajima *et al.* 2004). Analysen in unserer Arbeitsgruppe von Splinter, Jakob *et al.* (2010) schätzten die durch den hier verwendete UVA-Stickstofflaser lokal applizierte Dosis auf einen Bereich von einigen hundert Gray. Demzufolge eignete sich die LMI als zusätzliches Verfahren die Rekrutierung von CtIP auch in G1 in Anhängigkeit der Präsenz oder Abwesenheit von RNF138 zu analysieren. Publikationen konnten zeigen, dass CtIP nach Induktion oxidativer Schäden durch Laserbestrahlung an die Schadensstelle rekrutiert wird (You, Shi *et al.* 2009, Schmidt, Galanty *et al.* 2015) und nach Sartori, Lukas *et al.* (2007) sowie Wang, Qiu *et al.* (2018) ist CtIP-GFP etwa eine viertel Stunde nach Bestrahlung nachzuweisen. Daher sollte zunächst die Rekrutierung von CtIP-mCherry an Laser-induzierte Schäden verifiziert und anschließend analysiert werden, ob eine Rekrutierung auch spezifisch in G1-Phase-Zellen nachzuweisen ist und welchen Einfluss die RNF138-Defizienz auf die CtIP-Rekrutierung hat. Hierfür wurden U2OS-WT sowie U2OS-RNF138-KO-Zellen transient mit einem Plasmid transfiziert, auf dem mCherry-getaggtes CtIP codiert ist (vgl. Kapitel 2.2.6.2 und 2.1.10). 24 h nach der Plasmid-Transfektion wurden die Zellen für 30 min mit 0,5 µM Hoechst 33342 sensibilisiert (vgl. Kapitel 2.2.4.1) und anschließend für 30 min Laserstreifen gesetzt (vgl. Kapitel 2.2.3.5). Die Sensibilisierung mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 diente dazu anhand des Bleichens (*bleaching*) die Schadensinduktion direkt überprüfen zu können (Celeste, Fernandez-Capetillo *et al.* 2003, Dinant, de Jager *et al.* 2007). Da nach Lafranchi, de Boer *et al.* (2014) nach 10 Gy Röntgenbestrahlung der Höhepunkt der CtIP-Rekrutierung 50 min nach Bestrahlung ist und Wang, Qiu *et al.* (2018) die CtIP-Rekrutierung bis 90 min nach Laserbestrahlung verfolgen konnte, wurden für 30 min so viele Zellen wie möglich Laser-bestrahlt, die Proben anschließend für weitere 30 min im Brutschrank inkubiert und dann fixiert. Folglich konnte so die Rekrutierung von CtIP-mCherry an Laser-induzierte Schäden zwischen 30 min und 60 min untersucht werden. Für die zellzyklusspezifische Analyse wurden die Zellen zusätzlich immunhistochemisch gegen CENP-F gefärbt. Die mikroskopische Evaluierung bestätigte zunächst eine Rekrutierung von CtIP-mCherry an Laser-induzierte Schäden 30-60 min nach Bestrahlung. Auch speziell in G1-zellen war eine Rekrutierung des Resektionsfaktors nachzuweisen. In RNF138-defizienten Zellen war die Rekrutierung von CtIP-mCherry an die Schadensstelle sowohl in asynchronen als auch spezifisch G1-Phase-Zellen signifikant verringert. Während sich der durchschnittliche Anteil an CtIP-positiven, Laser-bestrahlten Zellen in drei unabhängigen Experimenten in WT-Zellen auf knapp 80% in asynchronen und 67% in G1-Phase-Zellen belief, waren in RNF138-KO-Zellen von allen Laser-bestrahlten Zellen lediglich noch 14,3% asynchrone und 12,5% G1-Phase-Zellen CtIP-positiv (Abbildung 51).

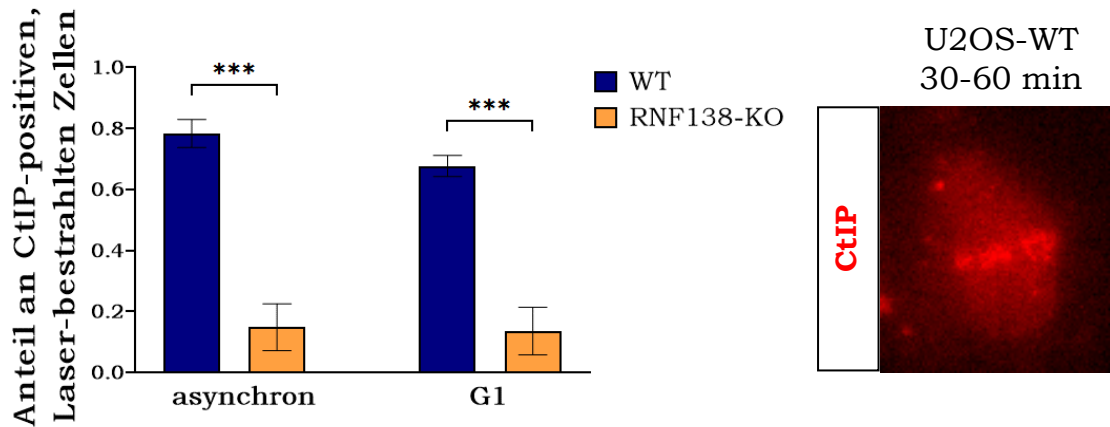


Abbildung 51: Sowohl in asynchronen als auch speziell G1-Phase-Zellen wird CtIP in RNF138-KO-Zellen signifikant weniger an Laser-induzierte Schäden rekrutiert. Humane Osteosarkomzellen (U2OS-Zellen) und RNF138-defiziente Osteosarkomzellen (U2OS-RNF138-KO) wurden mittels Hoechst angefärbt und für 30 min Laserstreifen gesetzt. Nun wurden die Zellen für weitere 30 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert, anschließend fixiert und gegen CtIP und CENP-F gefärbt. Schlussendlich wurde so die Rekrutierung von CtIP in asynchronen und speziell G1-Phase U2OS-WT- im Vergleich zu U2OS-RNF138-KO-Zellen 30-60 min nach Laserbestrahlung untersucht. CENP-F diente als Zellzyklusmarker für die zellzyklusspezifische Auswertung. Es wurden insgesamt pro Petrischale zunächst je 20 asynchrone (A) und anschließend speziell 10 G1-Phase (CENP-F-negative) (B) anhand des Hoechst-Signals identifizierte Laser-bestrahlte Zellen ausgewertet (n = 3). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung ($SD = standard deviation$) der jeweils drei voneinander unabhängig bestrahlt und ausgewerteten Petrischalen. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-test bestimmt; (***) = $P < 0,001$.

3.5.2. Interaktion des Resektionsfaktors CtIP mit der E3 Ubiquitin-Ligase RNF138

Zuvor konnten bereits die negativen Auswirkungen der Defizienz von RNF138 auf die Ausbildung von CtIP-Foci gezeigt werden (vgl. Abbildung 50). Um zu prüfen, ob RNF138 in G1 direkt auf CtIP wirkt oder möglicherweise noch weitere Faktoren beteiligt sind, wurde die Interaktion von CtIP mit RNF138 in G1-Phase-Zellen analysiert. Dies wurde mittels Ko-Immunpräzipitation G1-sortierter unbestrahlter, mit 30 Gy Röntgen oder 30 Gy Kohlenstoffionen (UNILAC: Primärenergie 6,5 MeV/u; LET: 325 keV/ μm) bestrahlter Hela.S-Fucci-WT-Zellen realisiert (vgl. Kapitel 2.2.7.3). Über magnetische *Protein G Beads* konnte CtIP mitsamt seinen Interaktionspartnern präzipitiert werden und diese mit Hilfe eines Westernblots nachgewiesen werden. Somit konnte festgestellt werden, dass CtIP und RNF138 in G1 interagieren. Jedoch war diese Interaktion nicht strahlungsabhängig (Abbildung 52). Zur Kontrolle wurden ebenfalls *Protein G Beads* mit einem monoklonalen IgG₁ Kontrollantikörper der Maus (Isotypkontrolle) verwendet, um unspezifische Bindungen des Proteins CtIP ohne spezifischen CtIP-Antikörper zu überprüfen (vgl. Kapitel 2.1.7). Die Kontrolle zeigte, dass keine der im Gesamtlysats enthaltenen Proteine an den Isokontrollantikörper gebunden hatten. Zusätzlich zu den präzipitierten Proteinen (*IP CtIP*) wurde zwecks einer besseren Aussagekraft zudem eine Probe des für die IP eingesetzten Gesamtzelllysats (*input*) aufgetragen.

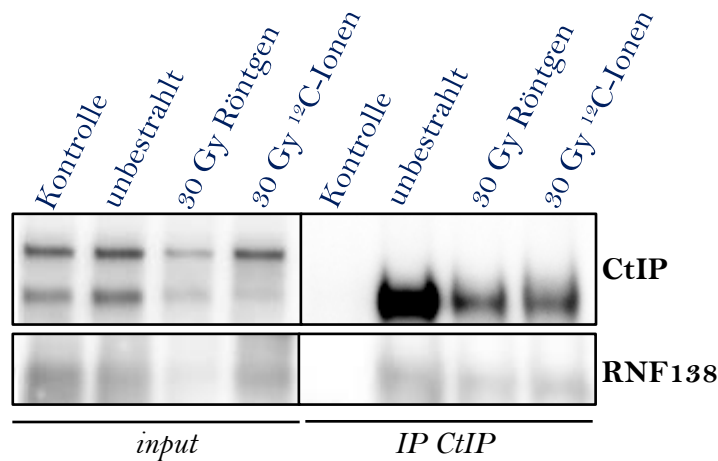


Abbildung 52: Unabhängig von Bestrahlung interagiert RNF138 mit CtIP in G1-Phase-Zellen. Humane Zervixkarzinomzellen mit stabil integriertem Fucci-System (Hela.S-Fucci-WT) wurden mit 30 Gy Röntgen bzw. Kohlenstoffionen (^{12}C) am UNILAC (Primärenergie 6,5 MeV/u; LET: 325 keV/ μm) bestrahlt und 1 h nach Bestrahlung am *Cell Sorter* zellzyklusspezifisch sortiert. Zudem wurden unbestrahlte Proben mitgeführt und ebenfalls sortiert. Nun wurden aus je 1 Mio. bestrahlten sowie unbestrahlten G1-Phase-Zellen mittels *an Dynabeads* gekoppeltem CtIP-Antikörper CtIP daran gebunden, sodass anschließend RNF138 als Interaktionspartner von CtIP im Westernblot nachgewiesen werden konnte. Der *Input* beschreibt die Eingangsproteine, die in die Immunpräzipitation (IP) eingesetzt wurden, wohingegen die *IP CtIP* alle direkt oder über CtIP an den CtIP-Antikörper gebundenen Proteine beschreibt. In der Kontrolle wurden lediglich *Dynabeads* ohne gebundenen Antikörper verwendet, womit die Funktionsfähigkeit der IP verifiziert werden konnte.

Um die zuvor gezeigte Interaktion von CtIP mit RNF138 auch in die andere Richtung zeigen, wurde ein Plasmid hergestellt, das RNF138-*getaggetes* FLAG codiert, da das Expressionslevel von RNF138 nicht ausreichend war, um eine IP des endogenen Proteins durchzuführen. Zu diesem Zweck wurde der GFP-Tag aus dem kommerziell erworbenen RNF138-GFP Plasmid von Addgene (vgl. Kapitel 2.1.10) (Ismail, Gagne *et al.* 2015) in ein FLAG-Tag umkloniert. Dies war erforderlich, da die Interaktion zellzyklusabhängig gezeigt werden sollte und eine Integration des grün-fluoreszierenden RNF138-GFP eine Sortierung der Hela.S-Fucci-Zellen anhand ihrer fluoreszenzmarkierten Zellzyklusmarker unmöglich gemacht hätte.

Zu aller erst wurde die Funktionsfähigkeit des RNF138-GFP Plasmids von Addgene verifiziert, indem U2OS-Zellen transient für 24 h mit jenem Plasmid transfiziert (vgl. Kapitel 2.1.10 und 2.2.6.2) und anschließend mit Laser bestrahlt wurden (vgl. Kapitel 2.2.3.5). Schmidt, Galanty *et al.* (2015) zeigten GFP-RNF138 Rekrutierung 5 min und 25 min nach Laserbestrahlung. Nach Ismail, Gagne *et al.* (2015) und Han, Liang *et al.* (2016) ist eine Rekrutierung von RNF138-GFP nach Laser-induzierten bereits nach 1 min bzw. 2 min nachzuweisen. Wie Abbildung 53A belegt, konnte dies in dieser Arbeit über Lebendzellmikroskopie bestätigt werden. Auf Grundlage dessen wurde das RNF138-GFP Plasmid verwendet, um den GFP-Tag in einen nicht fluoreszierenden und zudem viel kleineren FLAG-Tag umzuklonieren.

Hierzu wurden zwei Primer konstruiert, die direkt die jeweils angrenzende Linker-Region um die EGFP-Sequenz herum amplifizieren und zusätzlich am jeweiligen 5'-Ende je 12 Nukleotide der FLAG-Tag-Sequenz tragen, um diese Enden später ligieren und somit ein intaktes Plasmid zu erhalten. Die Sequenzen der konstruierten Primer sind Kapitel 2.1.11 zu entnehmen. Nach der Amplifikation des Plasmids wurden die Enden

des PCR-Produkts ligiert (vgl. Kapitel 2.2.6.4) und das neu entstandene RNF138-FLAG-Plasmid einer Größe von 4782 bp in *E.coli* Bakterien transformiert (vgl. Kapitel 2.2.6.5) und so vermehrt, um es schlussendlich mit Hilfe der Maxi-Prep von *Qiagen* isolieren zu können (vgl. Kapitel 2.2.6.6). Mittels Sequenzanalyse konnte die Promotor-, FLAG- und RNF138-Sequenz eindeutig bestätigt werden (Anhang 3). Zur Überprüfung der Funktionalität wurden U2OS-Zellen transient für 24 h mit dem neu generierten RNF138-FLAG-Plasmid transfiziert (vgl. Kapitel 2.1.10 und 2.2.6.2) und ebenfalls mit Laser bestrahlt, um die RNF138-Rekrutierung nachverfolgen zu können (vgl. Kapitel 2.2.3.5). Da der FLAG-Tag nun keine Eigenfluoreszenz mehr aufweist, konnte die Rekrutierung nicht wie zuvor direkt live beobachtet, sondern musste über Immunfluoreszenzfärbung nach Fixierung der Zellen dargestellt werden. Wie in Abbildung 53B ersichtlich konnte 5 min nach Bestrahlung und immunhistochemischer Färbung gegen FLAG die Rekrutierung der Ubiquitin-Ligase an zuvor mit Laser induzierten Schäden gezeigt werden, was die Funktionalität des erstellten RNF138-FLAG-Plasmids belegte. 53BP1 diente als Schadensmarker, der mit Laser induzierten Schäden.

Schlussendlich musste leider dennoch festgestellt werden, dass eine Interaktionsanalyse (IP) von RNF138 mit CtIP mittels FLAG-IP nach Transfektion des generierten Plasmids aufgrund zu vieler unspezifisch aufgetretenen Banden nicht erfolgreich war.

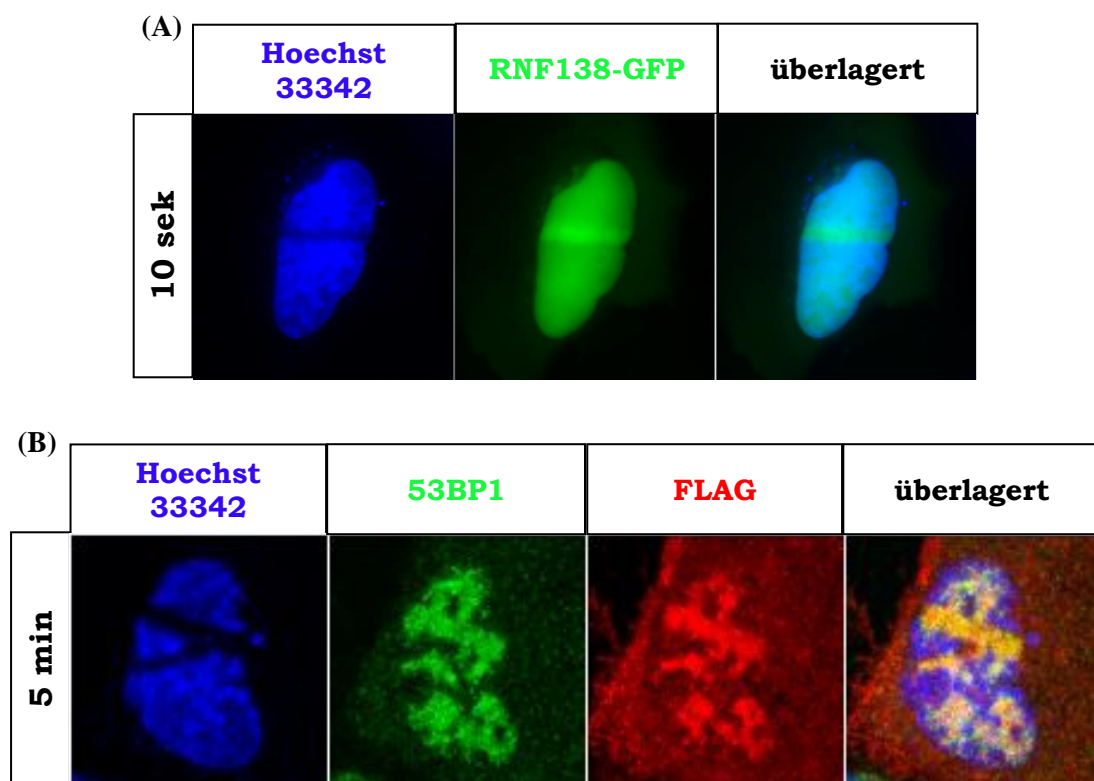
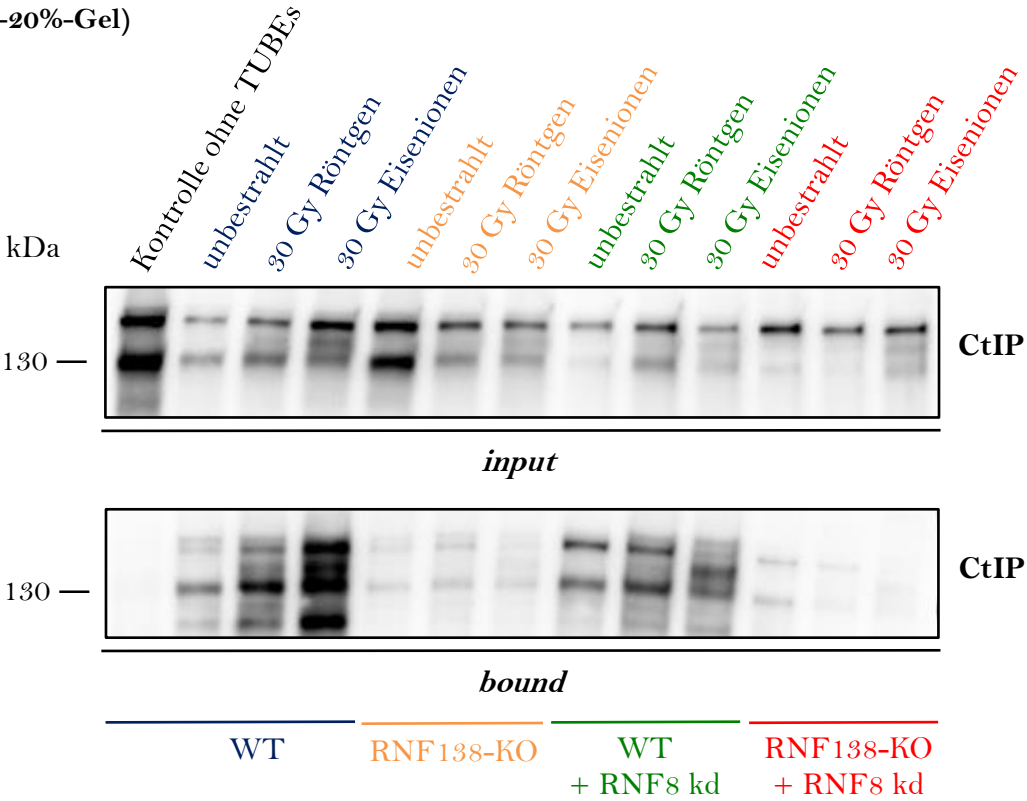


Abbildung 53: RNF138-GFP wird an Laser-induzierte Schäden rekrutiert (A). Auch das neu generierte RNF138-FLAG-Plasmid zeigt die Rekrutierung von RNF138 binnen Sekunden (B). In humane Osteosarkomzellen (U2OS-Zellen) wurde mittels jetPRIME transient GFP- bzw. FLAG-getaggttes RNF138 transfiziert. 24 h später wurden die Zellkerne mittels Hoechst angefärbt, Laserstreifen gesetzt und die Rekrutierung von RNF138 zehn Sekunden nach Bestrahlung evaluiert. Die Rekrutierung von RNF138-GFP konnte live beobachtet werden, wohingegen im Fall von FLAG-getaggttem RNF138 die Zellen fixiert und immunhistochemisch gegen FLAG als auch 53BP1 als Schadensmarker gefärbt wurden.

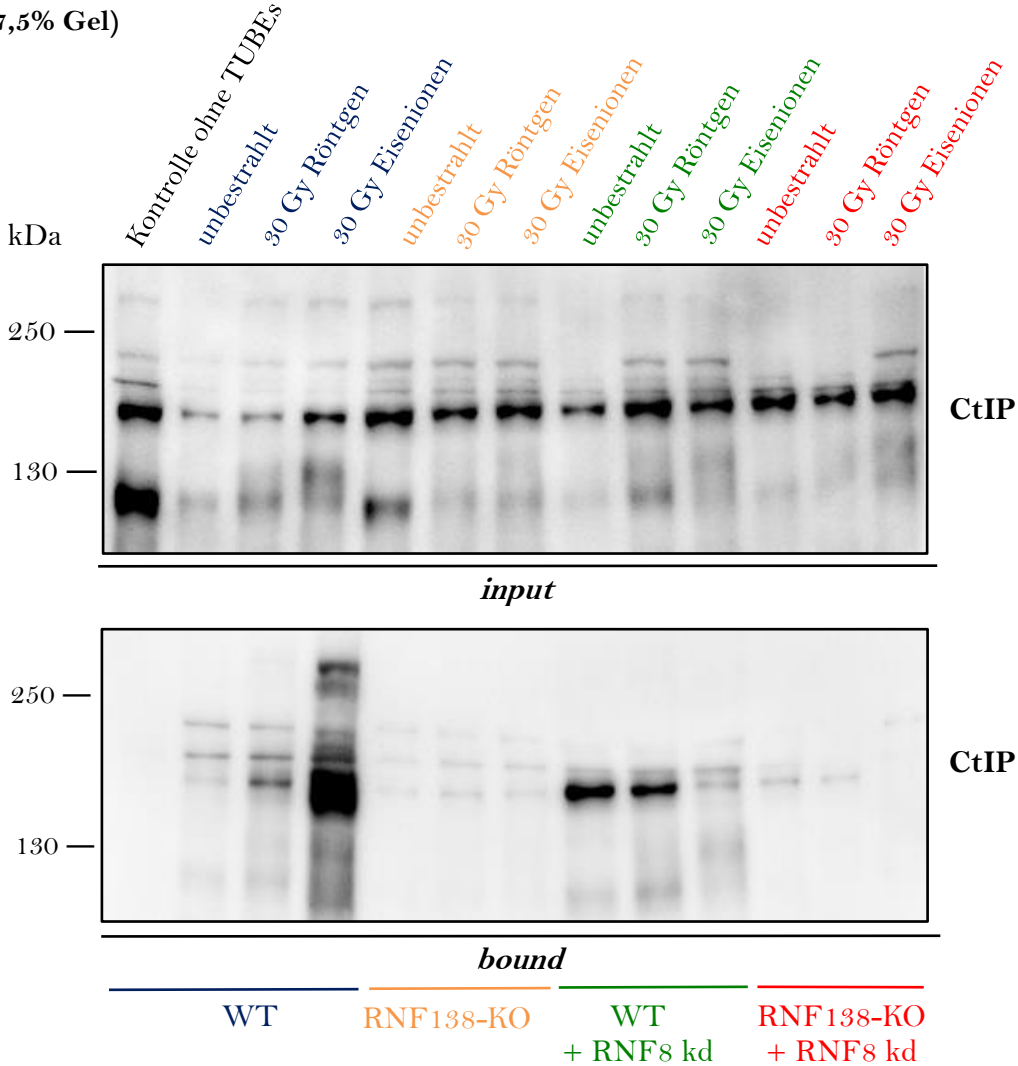
3.5.3. RNF138 ist für die Ubiquitinierung von CtIP in G1-Phase-Zellen essentiell

Immunfluoreszenzanalysen zuvor offenbarten, dass RNF138 die Rekrutierung von CtIP an komplexen Schäden nach Ionenbestrahlung beeinflusst (Abbildung 50). Nach Schmidt, Galanty *et al.* (2015) ist in S/G2 die Modifikation durch Ubiquitinierung von CtIP durch RNF138 notwendig, um den Resektionsfaktor an den Schaden zu rekrutieren. Daher sollte im Folgenden mit Hilfe eines Ubiquitin-*TUBE-Pulldowns* untersucht werden, ob die Ubiquitin-Ligase RNF138 auch in G1 nach Induktion komplexer Schäden für die Ubiquitinierung von CtIP von entscheidender Bedeutung ist. Da sich zuvor zeigte, dass neben RNF138 auch die Ubiquitin-Ligase RNF8 bei der Ubiquitinierung von Ku80 eine Rolle spielt, wurde in diesem Zuge auch direkt RNF8 kd Zellen mit analysiert. Hierfür wurden Hela.S-Fucci Zellen mit 30 Gy Röntgen bzw. 30 Gy Eisenionen (SIS18: Primärenergie: 1 GeV/u; LET: 155 keV/μm) bestrahlt, 1 h nach Bestrahlung anhand ihrer fluoreszenzgekoppelten Zellzyklusmarker sortiert und spezifisch Lysate aus einer Millionen G1-Phase-Zellen für den Ubiquitin-*Pulldown* verwendet. Unbestrahlte Proben wurden ebenfalls mitgeführt. Die Funktionsfähigkeit des Assays wurde wiederum über *Beads* ohne gebundene TUBEs verifiziert. Zwecks der späteren Quantifizierung wurde auch in diesem Experiment neben den an die Ubiquitin-*Beads* gebundenen Proteinen (*bound*) zusätzlich eine Probe des für den *Pulldown* verwendeten Lysats (*input*) analysiert (Abbildung 54A). Das *bound*-Signal wurde am Ende auf das *input*-Signal und die unbestrahlten WT-Proben normiert (Abbildung 54C). In WT-Zellen (blau) zeigte die Untersuchung eine strahlungs- und LET-abhängige zunehmende Modifikation durch Ubiquitinierung von CtIP, wohingegen in RNF138-defizienten Zellen weder in unbestrahlten noch in Röntgen- oder Eisenionen-bestrahlten Proben eine deutliche Ubiquitinierung von CtIP ausgemacht werden konnte (orange und rot). Nach RNF8-Depletion in WT-Zellen (grün) blieb die Proteinmodifikation durch Ubiquitinierung in unbestrahlten, Röntgen- und mit Eisenionen-bestrahlten Proben nahezu konstant. Der Tatsache geschuldet, dass die Depletion der E3 Ubiquitin-Ligase an sich schon eine drastische Reduktion des Levels an ubiquitiniertem CtIP zur Folge hatte (orange), konnte aufgrund des zusätzlichen RNF8 kd (rot) keine maßgebliche Veränderung mehr beobachtet werden (Abbildung 54C). Abbildung 54B zeigt dieselben Proben wie in Abbildung 54A auf einem niedrigprozentigerem Gel (7,5%) aufgetragen, das eine bessere Auftrennung großer Proteine erlaubt. Hierbei lässt sich besser das für ubiquitinierte Proteine typische Bandenmuster mehrerer Banden mit kleinem Größenunterschied erkennen. Ubiquitin weist ein Molekulargewicht von 8,5 kDa auf, weshalb unterschiedliche Längen an Ubiquitinketten zu verschiedenen Größen des durch Ubiquitin modifizierten Proteins führt (Xu und Jaffrey 2013).

(A) (4-20%-Gel)



(B) (7,5% Gel)



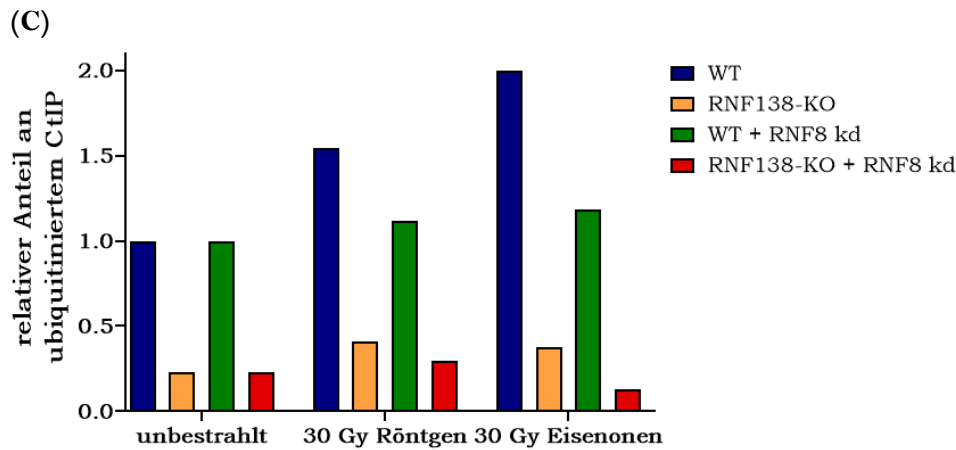


Abbildung 54: Unabhängig von der Bestrahlung mit Röntgen oder Eisenionen konnte in RNF138-KO-Zellen drastisch in der G1-Phase weniger ubiquitiniertes CtIP nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich nach Bestrahlung in den WT-Zellen eine verstärkte Ubiquitinierung von CtIP. Humane Zervixkarzinomzellen mit stabil integriertem Fucci-System (Hela.S-Fucci-WT), jene, die RNF138-defizient sind (Hela.S-Fucci-RNF138-KO), und die jeweiligen Zelllinien mit zusätzlichem siRNA-induzierten RNF8 kd (Hela.S-Fucci-WT + RNF8 kd bzw. Hela.S-Fucci-RNF138-KO + RNF8 kd) wurden mit 30 Gy Röntgen oder 30 Gy Eisenionen am SIS (Primärenergie: 1 GeV/u; LET: 155 keV/ μ m) bestrahlt und 1 h nach Bestrahlung am *Cell Sorter* zellzyklusspezifisch sortiert. Zudem wurden unbestrahlte Proben mitgeführt und ebenfalls sortiert. Nun wurden aus je 1 Mio. bestrahlten sowie unbestrahlten G1-Phase WT- (blau), RNF138-KO- (orange), WT + RNF8 kd (grün) bzw. RNF138-KO + RNF8 kd (rot) Zellen mittels *TUBE* (*Tandem Ubiquitin Binding Entities*) alle ubiquitinierten Proteine gebunden. Anschließend wurde ubiquitiniertes CtIP im Westernblot analysiert (A) und (B). Der *Input* beschreibt die Eingangsproteine, die im *Pulldown* eingesetzt wurden, wohingegen die gebundene Fraktion (*bound*) alle ubiquitinierten, *TUBE*-gebundenen Proteine beschreibt. In der Kontrolle wurden *Beads* verwendet, an die keine *TUBEs* gebunden waren, womit die Funktionsfähigkeit des Ubiquitin-*Pulldowns* nachgewiesen werden konnte. Die quantitative Analyse erfolgte mit der Software ImageJ (C). In diesem Fall wurde zunächst das *bound*-Level auf den jeweiligen *input* an CtIP normiert. Für eine vereinfachte Vergleichbarkeit wurden die unbestrahlten Proben des WT (blau) und WT + RNF8 kd (grün) eins gesetzt und die bestrahlten Proben sowie die unbestrahlte RNF138-KO Probe (orange) darauf normiert. Zudem wurden unbestrahlte Proben des RNF138-KO (orange) und RNF138-KO + RNF8 kd Proben (rot) gleichgesetzt und die dazugehörigen bestrahlten Proben darauf normiert.

3.6. Auswirkungen der Ubiquitinierung durch RNF138 auf die DNA-DSB-Reparatur und das klonogene Zellüberleben

Mit dem Wissen, dass sich die Defizienz der Ubiquitin-Ligase RNF138 negativ auf die Rekrutierung von CtIP auszuwirken scheint und so die DNA-End-Resektion beeinträchtigt, stellt sich abschließend die Frage, welche Auswirkungen dies auf die Reparatur von DSBs und das klonogene Zellüberleben hat. DNA-Schäden in Form von DSBs stellen die größte Bedrohung für eine Zelle dar zu entarten (Frankenberg-Schwager und Frankenberg 1990, Jackson und Bartek 2009), weshalb die Analyse der DSB-Reparatur nicht nur für die Einschätzung des Tumorrisikos von enormer Wichtigkeit ist, sondern auch für die Krebstherapie (Jeggo und Löbrich 2015). Für die Onkologie, die Therapie von Tumoren, und Entwicklung neuer Möglichkeiten zur Bekämpfung von Krebs spielt die Auswirkung auf das Zellüberleben eine maßgebliche Rolle (Mirzayans, Andrais *et al.* 2018). Daher wurde im letzten Kapitel dieser Arbeit die Folgen der RNF138-Defizienz für die DSB-Reparatur einerseits und das klonogene Zellüberleben andererseits nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten dargestellt.

3.6.1. Bedeutung der Ubiquitin-Ligase RNF138 für die DSB-Reparatur nach Induktion komplexer Schäden durch Ionenbestrahlung

Da Resektion in G1 ein Phänomen darstellt, welches vermehrt nach Induktion komplexer Schäden zu beobachten ist (Yajima, Fujisawa *et al.* 2013, Auerbeck, Ringel *et al.* 2014) und sich eine Relevanz der Ubiquitin-Ligase RNF138 für die Resektion auch nur nach komplexen Schäden offenbarte, sollte die DSB-Reparatur folglich auch nach Ionenbestrahlung und Induktion komplexer DSBs untersucht werden. Zu Vergleichszwecken wurden zudem die Auswirkungen der RNF138-Defizienz auf die Reparatur von DSBs nach niedrig-LET Röntgenbestrahlung untersucht. Zur Evaluation des Einflusses der RNF138-Defizienz auf die DSB-Reparatur nach hoch-LET-Bestrahlung, wurden ebenfalls U2OS-WT- sowie U2OS-RNF138-KO-Zellen verwendet und mit 1,24 Gy respektive 5×10^6 Eisenionen pro cm^2 (SIS18: Primärenergie: 1 GeV/u; LET: 155 keV/ μm) oder 5×10^6 Kohlenstoffionen pro cm^2 (UNILAC: Primärenergie: 11,4 MeV/u; LET: 168 keV/ μm) bestrahlt und 15 min, 2 h, 3 h, 4 h und 10 h nach Bestrahlung fixiert. Röntgenbestrahlte U2OS-WT- und U2OS-RNF138-KO-Zellen wurden mit 1 Gy bestrahlt und 15 min, 2 h, 4 h sowie 8 h nach Bestrahlung fixiert. Um bei der Auswertung Zellen herausfiltern zu können, die sich in der S-Phase befanden oder nach der Bestrahlung durch die S-Phase gelaufen waren, wurde dem Kulturmedium unmittelbar nach Bestrahlung EdU einer Konzentration von 10 μM zugegeben. Nach erfolgter EdU-Click-Reaktion (vgl. Kapitel 2.2.4.3), γH2AX -Immunfluoreszenzfärbung zur Markierung von DSBs (Löbrich, Shibata *et al.* 2010) und Zellkernfärbung mittels DAPI (vgl. Kapitel 2.2.4.4. und 2.2.4.6), konnten die Zellen anhand ihrer DAPI-Intensität mit Hilfe der Metafer 4 Software in G1- und G2-Phase-Zellen aufgeteilt werden, wobei EdU-positive Zellen nicht berücksichtigt wurden. Nun wurde die durchschnittliche Anzahl an γH2AX -Foci pro Zellkern zellzyklusspezifisch im Fall der Ionenbestrahlten Proben zwei replizierten Datensätzen ermittelt (vgl. Kapitel 2.2.5.2). Nach niedrig-LET Röntgenbestrahlung konnten drei unabhängige Experimente durchgeführt und der gewichtete Mittelwert dargestellt werden. Die durchschnittliche Anzahl an γH2AX -Foci aller ausgewerteten Zellen wurde auf die Anzahl an γH2AX -Foci

15 min nach Bestrahlung normiert, wobei die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci der jeweiligen unbestrahlten Proben zuvor immer abgezogen wurde.

Für G1-Phase U2OS-WT-Zellen betrug die gemittelte Anzahl an γ H2AX-Foci 15 min nach Röntgenbestrahlung durchschnittlich 23,0 Foci pro Zellkern, für RNF138-defiziente G1-Phase-Zellen 22,5. Im Fall der analysierten G2-Phase-Zellen konnten in WT-Zellen 31,5 und für RNF138-KO-Zellen 30,4 γ H2AX-Foci pro Zellkern im Mittel ausgemacht werden. Weder in G1 noch in G2 konnte nach niedrig-LET Röntgenbestrahlung ein signifikanter Unterschied der relativen Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zellkern in Abhängigkeit von RNF138 beobachtet werden (Abbildung 55A und Abbildung 55B). In G2 war ansatzweise zu erkennen, dass eine RNF138-defiziente Zellen zu späten Zeitpunkten 4 h und 10 h DSBs schlechter reparieren können als der WT.

Die maximale Anzahl an γ H2AX-Foci pro G1-Phase Zellkern 15 min nach Bestrahlung mit Eisenionen (SIS18: Primärenergie: 1 GeV/u; LET: 155 keV/ μ m; Fluenz: 5×10^6 T./cm²) lag in WT-Zellen bei 21,6 und in RNF138-KO-Zellen bei 22,7 γ H2AX-Foci. In G2-Phase-Zellen konnten maximal 29,0 γ H2AX-Foci in WT-Zellen und 30,9 γ H2AX-Foci in RNF138-defizienten Zellen ausgemacht werden. Die DSB-Reparaturkinetiken in WT- und RNF138-KO-Zellen unterschieden sich weder in G1- noch in G2-Zellen (Abbildung 55C und Abbildung 55D).

Nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen (UNILAC: Primärenergie: 11,4 MeV/u; LET: 168 keV/ μ m; Fluenz: 5×10^6 T./cm²) waren in G1-Phase U2OS-WT-Zellen 15 min nach Bestrahlung durchschnittlich 17,7 γ H2AX-Foci pro Zellkern auszumachen, in RNF138-defizienten G1-Phase-Zellen waren es 16,9. Untersuchte G2-Phase WT-Zellen wiesen im Mittel 22,4 und RNF138-KO-Zellen 21,6 γ H2AX-Foci pro Zellkern auf. In beiden analysierten Zellzyklusphasen war eine leicht schlechtere DSB-Reparatur in RNF138-defizienten im Vergleich zu den WT-Zellen zu verzeichnen. 10 h nach Bestrahlung war der Unterschied sowohl in G1 als auch G2 signifikant (Abbildung 55E und Abbildung 55F).

Ausschließlich zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Verlauf alle Kinetiken durch folgende Formel veranschaulicht: $Y=Y_0 \cdot \exp(-k \cdot x)$ mit x: Zeit und Y: Population; Y_0 : maximale Start-Population; k: Konstante.

Zusammenfassend konnte gesagt werden, dass sich unabhängig der Zellzyklusphase eine RNF138-Defizienz nur nach Induktion komplexerer Schäden durch Kohlenstoffionenbestrahlung nachweisbar negativ auf die DSB-Reparatur auswirkte. In G2-Phase-Zellen war nach Induktion weniger komplexer Schäden durch Röntgen- oder Eisenionenbestrahlung ansatzweise eine minimal schlechtere DSB-Reparatur zu verzeichnen. Im Zeitraum zwischen 15 min bis 2 h nach Bestahlung, der die schnelle Reparaturkomponente beschreibt, war in keinem der analysierten Fälle ein Unterschied zwischen WT- und RNF138-KO-Zellen zu verzeichnen. Lediglich in der langsamen Reparaturkomponente zu späteren Zeitpunkten, 4 h und 10 h nach Bestrahlung, war nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen in RNF138-defizienten Zellen ein durchschnittlich signifikant höherer Anteil an verbleibenden γ H2AX-Foci pro Zellkern zu erkennen. Mit steigender Schadenskomplexität von Röntgen- über Eisen- bis zur Kohlenstoffionenbestrahlung schien sich die späte, langsame Komponente zu verlangsamen, sodass Unterschiede zwischen WT- und RNF138-KO-Zellen auszumachen waren.

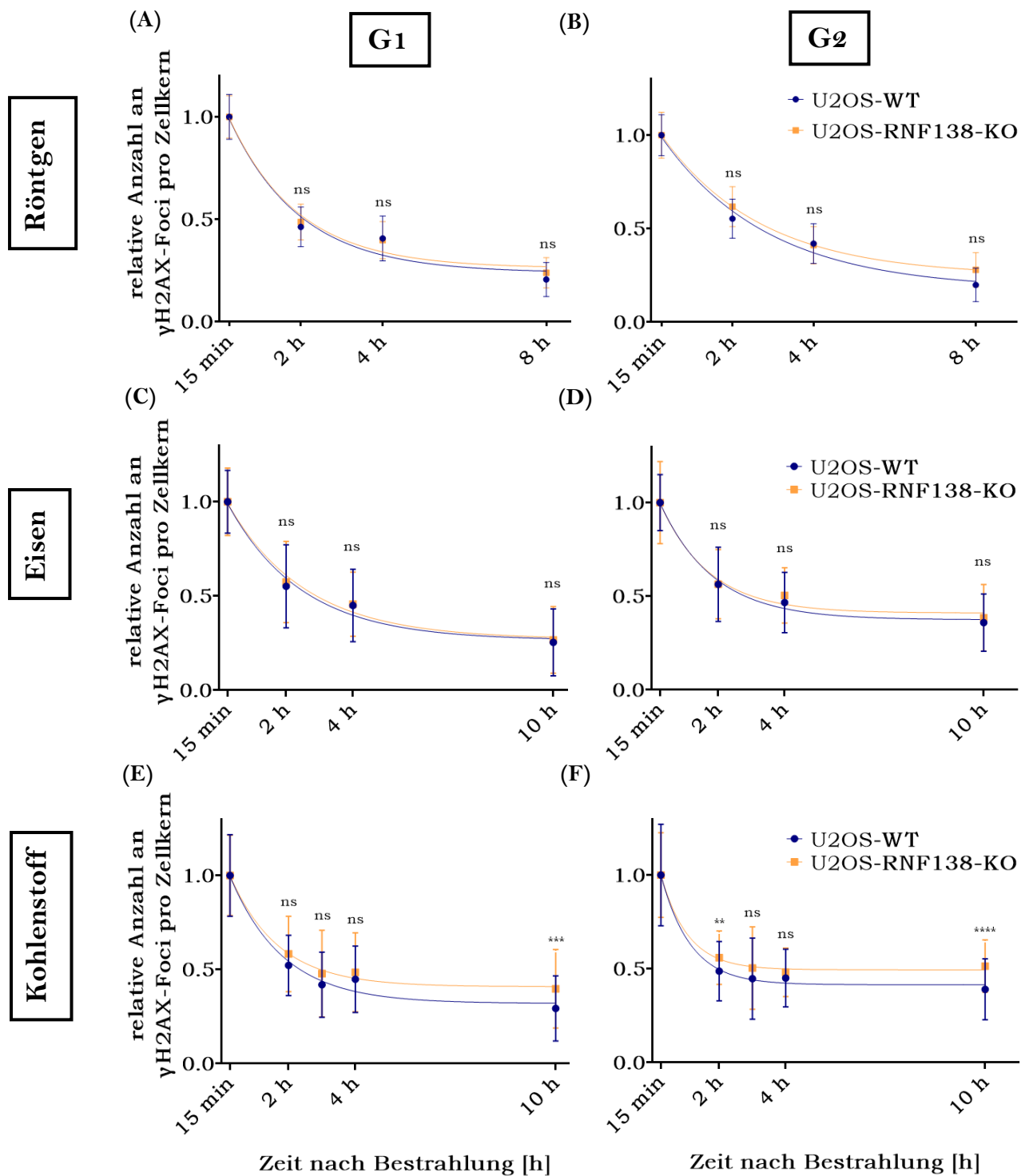


Abbildung 55: Leichter Reparaturdefekt in G1- und G2-Phase-RNF138-KO-Zellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen im Vergleich zu WT-Zellen. Humane Osteosarkom (U2OS-Zellen) RNF138-*Knockout*- (KO) oder Wildtypzellen (WT) wurden mit 1 Gy Röntgen (A) und (B), 1,24 Gy Eisenionen (Primärenergie: 1 GeV/u; LET: 155 keV/μm; Fluenz: 5×10^6 T./cm²) (C) und (D) bzw. 1,35 Gy Kohlenstoffionen (Primärenergie: 11,4 MeV/u; LET: 168 keV/μm; Fluenz: 5×10^6 T./cm²) (E) und (F) bestrahlt und anschließend die Anzahl an γ H2AX-Foci sowohl in G1- (A), (C) bzw. (E) als auch G2-Phase-Zellen (B), (D) bzw. (F) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung (15 min, 2 h, 3 h, 4 h, 8 h oder 10 h) evaluiert. EdU (10 μM) wurde direkt nach Bestrahlung dem Kulturmedium zugefügt und diente als Marker von Zellen, die während der Reparatur die S-Phase durchlaufen haben bzw. sich in der S-Phase befanden. Pro Zellzyklusphase wurden insgesamt mindestens 100 Zellen am MetaSystems ausgewertet. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung ($SD = \text{standard deviation}$) des gewichteten Mittelwerts im Fall von Röntgen aus 3 unabhängigen Experimenten, für Eisen- bzw. Kohlenstoffionenbestrahlung aus der Standardabweichung des Mittelwerts aus zwei Replikaten. Fit zur Veranschaulichung: $Y=Y_0 \cdot \exp(-k \cdot x)$. Die statistische Signifikanz wurde mittels mehrerer t-tests bestimmt; (**) = $P < 0,01$; (****) = $P < 0,0001$.

Um den zuvor beobachteten leichten Trend eines DSB-Reparaturdefekts in RNF138-defizienten Zellen besser einschätzen zu können, wurden zusätzlich zwei Proben generiert, in denen Rad51 mittels des Inhibitors B02 (50 μM) ausgeschaltet wurde. Die Inhibition des HR-Faktors Rad51 sollte Aufschluss darüber geben, ob der RNF138-Reparaturdefekt in G₂-Phase-Zellen 10 h nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen mit einem HR-Defekt vergleichbar ist. Die Bestrahlung erfolgte unter denselben Konditionen wie zuvor beschrieben. Auch EdU-Zugabe und die anschließende EdU-Click-Reaktion sowie Immunfluoreszenzfärbung gegen γH2AX wurden zeitgleich durchgeführt. Fixiert wurden die Zellen in diesem Fall 10 h nach Bestrahlung. Die Analyse in G₂-Phase-Zellen ergab eine ähnliche Anzahl an verbliebenen, relativen γH2AX -Foci in RNF138-KO (orange) (51,4%) und Rad51-inhibierten WT-Zellen (blau gestreift) (56,1%) 10 h nach Bestrahlung (Abbildung 56). Werte der WT- und RNF138-KO-Zellen 10 h nach Bestrahlung dienten zu Vergleichszwecken und sind daher identisch zu Abbildung 55.

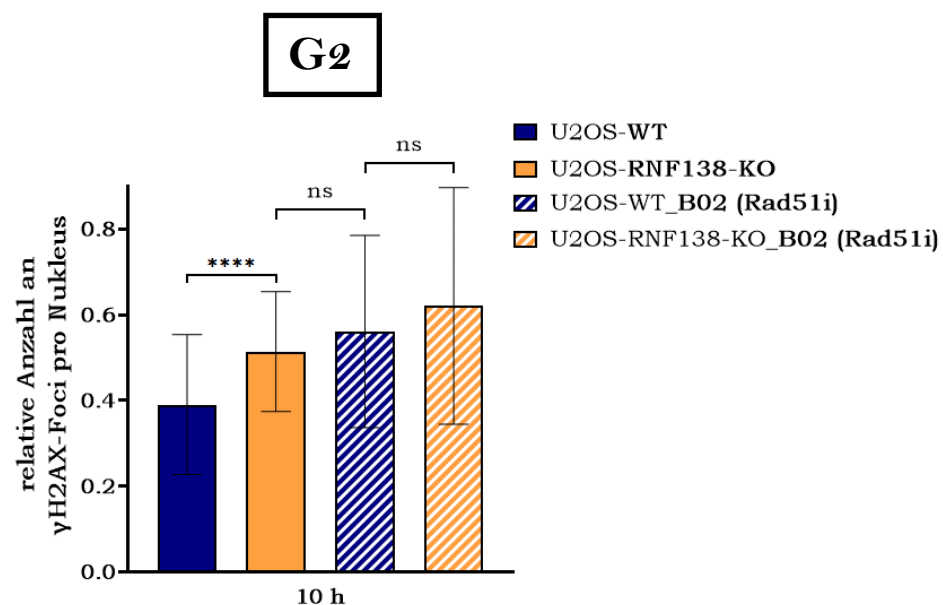


Abbildung 56: G₂-Phase-RNF138-KO- und Rad51-inhibierte WT-Zellen zeigten 10 h nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen einen vergleichbaren DSB-Reparaturdefekt. Humane Osteosarkom (U2OS) RNF138-Knockout- (KO) oder Wildtypzellen (WT) wurden 30 min vor Bestrahlung mit 50 μM Rad51-Inhibitor (B02) behandelt, daraufhin mit 1,35 Gy Kohlenstoffionen (Primärenergie: 11,4 MeV/u; LET: 168 keV/ μm ; Fluenz: 5×10^6 T./ cm^2) bestrahlt und anschließend die Anzahl an γH2AX -Foci in G₂-Phase-Zellen 10 h nach Bestrahlung evaluiert. Pro Zellzyklusphase wurden insgesamt mindestens 100 Zellen am MetaSystems ausgewertet. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung ($SD = \text{standard deviation}$) aus der Anzahl der gezählten Zellen ($n = 1$). Die statistische Signifikanz wurde mittels t-test bestimmt; ns = nicht signifikant; (****) = $P < 0,0001$.

3.6.2. Folge der RNF138-Depletion auf die DNA-DSB-Reparatur in bereits Artemis-defizienten Zellen nach Induktion von DSBs unterschiedlicher Komplexität

Alle zuvor gewonnenen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Komplexität der generierten Schäden ein entscheidender Faktor für eine Beteiligung der E3 Ubiquitin-Ligase RNF138 in G₁ darstellt. Um zu untersuchen, ob RNF138 möglicherweise auch an der Reparatur nach Induktion weniger komplexer DSBs durch niedrig-LET Röntgenbestrahlung beteiligt ist, wurde die DSB-Reparatur in Artemis-defizienten Zellen

(CJhTERT) nach Röntgenbestrahlung in G1 analysiert. Literaturdaten zeigen, dass Artemis-defiziente Zellen (CJhTERT) nach Röntgenbestrahlung in G1 zu späten Zeiten 4 h und 8 h nach Bestrahlung in der langsamen Reparaturkomponente einen DSB-Reparaturdefekt aufweisen (Biehs, Steinlage *et al.* 2017). Wird in diesen Artemis-defizienten Zellen zusätzlich der Resektionsfaktor CtIP mittels siRNA herunterreguliert, geht dieser DSB-Reparaturdefekt verloren und die Zellen scheinen ihre Schäden vergleichbar zu den unveränderten Wildtyp-Zellen (82-6 hTERT) zu reparieren (vgl. Figure 2A (Biehs, Steinlage *et al.* 2017)). Dies offenbarte, dass auch in G1 nach niedrig-LET-Bestrahlung und Induktion weniger komplexer Schäden ein geringfügiger Teil der Schäden resektionsabhängig repariert wird. Veröffentlichte DSB-Reparaturanalysen in CtIP-depletierten Zellen ließen nach Röntgenbestrahlung keinen Reparaturdefekt erkennen (Averbeck, Ringel *et al.* 2014, Biehs, Steinlage *et al.* 2017), was darauf hindeutet, dass der Hauptanteil der DSBs klassisch über resektionsunabhängige Wege repariert wird. Die in dieser Arbeit zuvor durchgeführten Experimente ließen darauf schließen, dass RNF138 für Ubiquitinierung des Resektionsfaktors CtIP und dessen Rekrutierung an komplexe DSBs in G1 wichtig ist und somit *upstream* von CtIP agiert. Die Evaluation der DSB-Reparatur in Artemis-defizienten Zellen erlaubt es, resektionsabhängige Reparaturprozesse nach niedrig-LET-Bestrahlung in G1 zu untersuchen und wurde in diesem Fall genutzt, um die Relevanz von RNF138 für resektionsabhängige Reparatur in G1 nach Röntgenbestrahlung auszumachen.

Zu diesem Zweck wurde die DSB-Reparatur in G1-Phase WT-82-6hTERT- im Vergleich zu Artemis-defizienten CJhTERT- und CJhTERT-Zellen mit zusätzlichem siRNA-induziertem RNF138 kd näher betrachtet. Die Effizienz des RNF138 kd wurde mittels Westernblot-Analyse bestätigt (Abbildung 57C). Für die Untersuchung der DSB-Reparatur nach niedrig-LET-Bestrahlung und Generierung weniger komplexer Schäden wurden die Zellen mit 2 Gy Röntgen (Abbildung 57A) bestrahlt (vgl. Kapitel 2.2.3.1 Röntgenbestrahlung) 15 min, 4 h und 8 h nach Bestrahlung fixiert und anschließend immunhistochemisch gegen γ H2AX als DSB-Marker und CENP-F als Zellzyklusmarker gefärbt (vgl. Kapitel 2.2.4.4). Zellkerne wurden zusätzlich mittels DAPI gegengefärbt (vgl. Kapitel 2.2.4.6). Nun wurde die Anzahl an γ H2AX-Foci speziell in CENP-F-negativen G1-Phase-Zellen in drei unabhängigen Experimenten evaluiert. Wie Abbildung 57A erkennen lässt, nahm die Anzahl an verbleibenden γ H2AX-Foci 4 h und 8 h nach Röntgenbestrahlung in CJhTERT mit zusätzlichem RNF138 kd (grün) wie in den 82-6hTERT Zellen (blau) ab, wohingegen die Anzahl an γ H2AX-Foci in den Artemis-defizienten CJhTERT-Zellen (orange) im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien signifikant höher war. 8 h nach Bestrahlung waren in 82-6 hTERT-Zellen im Schnitt noch 6,5 γ H2AX-Foci nachzuweisen, in CJhTERT G1-Phase-Zellen waren es 12,4 und in jenen mit zusätzlichem RNF138 kd durchschnittlich 8,0 γ H2AX-Foci pro Zellkern.

Zusammenfassend konnte demnach festgehalten werden, dass Artemis-defiziente Zellen zu späten Zeitpunkten nach Bestrahlung einen G1-Reparaturdefekt aufwiesen, der durch zusätzliches Ausschalten von RNF138 in diesen Zellen aufgehoben wurde.

Vergleichend zum Röntgenexperiment wurde die DSB-Reparatur nach Induktion komplexerer Schäden durch Bestrahlung mit alpha-Teilchen analysiert, um die Komplexität als Regulationsfaktor der Resektion in G1 zu untersuchen. Nach Bestrahlung mit 2 Gy alpha-Teilchen zur Induktion komplexerer Schäden (vgl. Kapitel 2.2.3.2) (Abbildung 57B) erfolgte die Fixierung 15 min, 8 h, 16 h und 24 h nach Bestrahlung. γ H2AX diente

ebenfalls als DSB- und CENP-F als Zellzyklusmarker. Die Analyse der γ H2AX-Foci in alpha-bestrahlten G1-Phase-Zellen ließ erkennen, dass die Anzahl an γ H2AX-Foci in WT 82-6 hTERT-Zellen von 15 min über 8 h und 16 h bis 24 h nach Bestrahlung immer weiter zurückging (blau). Die Abnahme der Anzahl an γ H2AX-Foci über die Zeit in Artemis-defizienten CJhTERT- und CJhTERT-Zellen mit zusätzlichem RNF138 kd war signifikant geringer (orange und grün) (Abbildung 57B). Artemis-defiziente CJhTERT-Zellen und jene mit zusätzlichem RNF138 kd wiesen 24 h nach Bestrahlung noch eine verbleibende Anzahl an γ H2AX-Foci von 15,6 bzw. 14,6 auf. In 82-6hTERT-Zellen lag der Wert bei durchschnittlich nur noch 11,7 γ H2AX-Foci pro Zellkern.

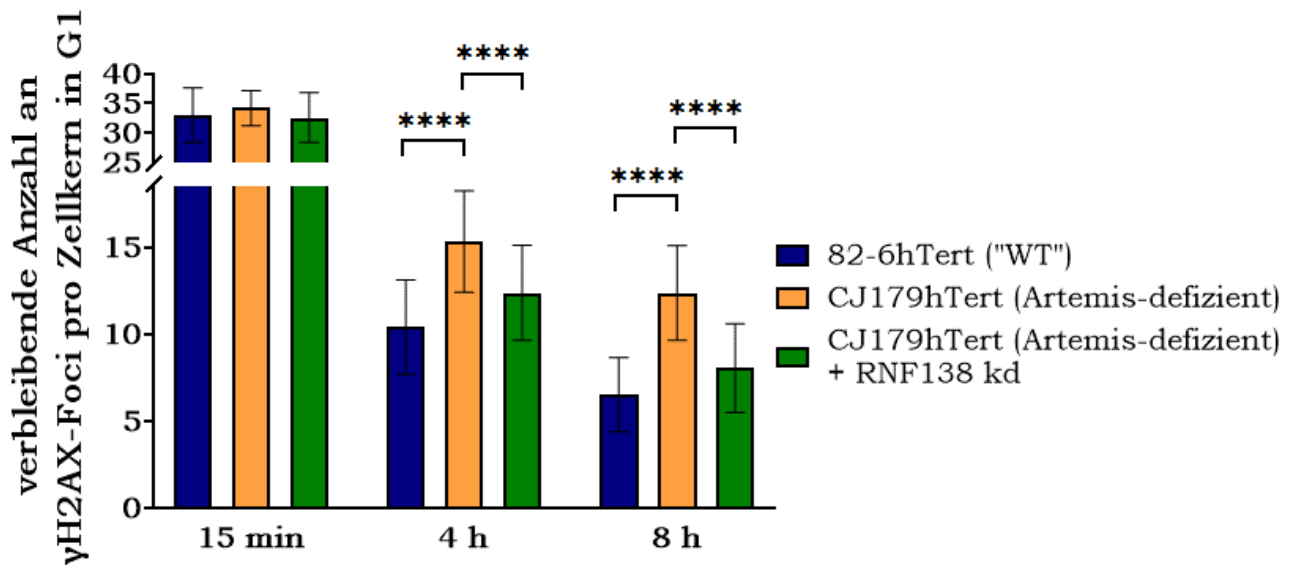
Anhandessen konnte zum Ausdruck gebracht werden, dass im Gegensatz zur Induktion weniger komplexer Schäden durch Röntgenbestrahlung eine zusätzliche Herunterregulation von RNF138 in Artemis-defizienten Zellen nach Induktion komplexerer Schäden durch alpha-Teilchen-Bestrahlung den G1 DSB-Reparaturdefekt der Artemis-defizienten Zellen nicht kompensieren konnte.

In dieser Arbeit erzielte Ergebnisse in Artemis-defizienten Zellen mit zusätzlichem RNF138 kd spiegeln die von Biehs, Steinlage *et al.* (2017) veröffentlichten Daten in Artemis-defizienten Zellen mit CtIP kd wieder. Während nach Induktion weniger komplexer Schäden durch Röntgenbestrahlung der Artemis-DSB-Reparaturdefekt zu späten Zeitpunkten nach Bestrahlung durch Herunterregulation des zuvor agierenden (*upstream*) Faktors CtIP oder RNF138 kompensiert werden konnte, war dies nach Induktion komplexerer Schäden durch alpha-Teilchen-Bestrahlung nicht zu beobachten. Der Theorie nach sind die Zellen nach niedrig-LET-Bestrahlung und CtIP-Depletion in der Lage von dem von Biehs, Steinlage *et al.* (2017) beschriebenen CtIP-/Resektions-abhängigen klassischen Weg der nicht-homologen Endverknüpfung (*resection-dependent c-NHEJ = canonical Non-homologous end joining*) zu einem anderen DSB-Reparaturmechanismus, möglicherweise dem klassischen Weg der nicht-homologen Endverknüpfung ohne CtIP-Beteiligung (cNHEJ), zu wechseln und so alle DSBs zu reparieren. Da Artemis in diesem soeben erwähnten DSB-Reparaturmechanismus nach CtIP (*downstream*) agiert, wird davon ausgegangen, dass bei einer Artemis-Defizienz alleine die Reparaturmaschinerie so weit vorangeschritten ist, dass ein Wechsel hin zu einem anderen Reparaturweg unmöglich ist und die Zellen die DSBs nicht mehr reparieren können (Biehs, Steinlage *et al.* 2017). Sind die induzierten Schäden komplexer, wie nach alpha-Teilchen-Bestrahlung, kann auch ein zusätzlicher RNF138 kd (vgl. Abbildung 57B) oder CtIP kd (vgl. Abbildung S3C (Biehs, Steinlage *et al.* 2017)) in bereits Artemis-defizienten Zellen den DSB-Reparaturdefekt nicht kompensieren.

Dies verdeutlichte, dass nicht alleine die Tatsache wie weit der DSB-Reparaturmechanismus bereits vorangeschritten ist, ausschlaggebend ist, ob die Depletion eines für die Resektion essentiellen Faktors einen DSB-Reparaturdefekt zur Folge hat, sondern auch die Komplexität der induzierten Schäden.

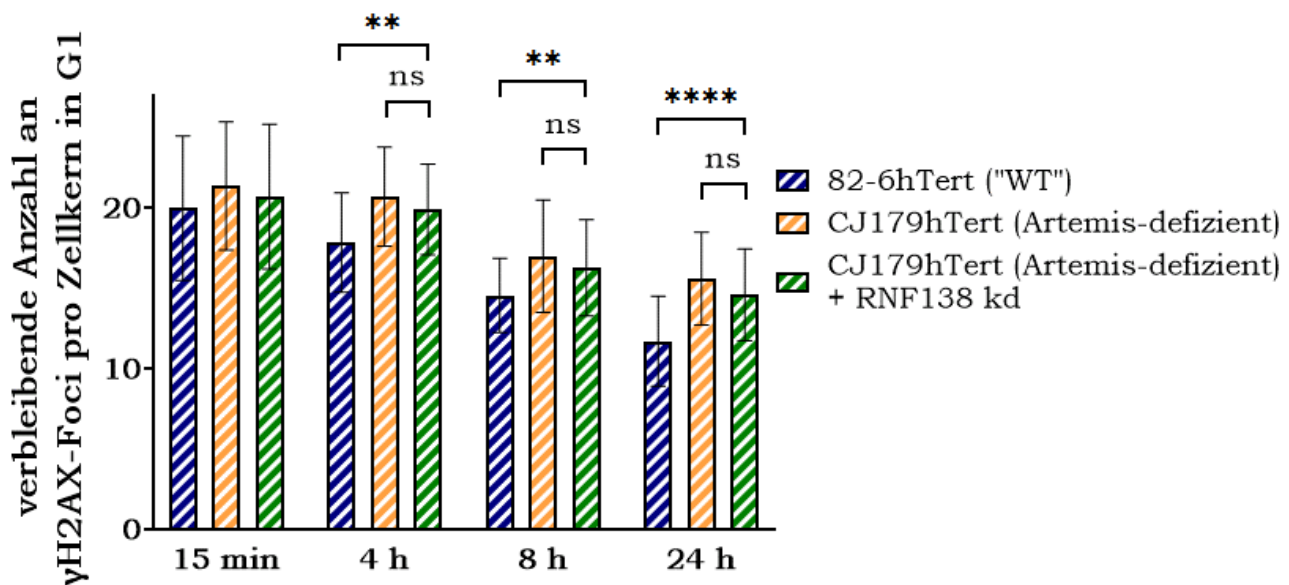
(A)

Röntgen



(B)

alpha-Teilchen



(C)

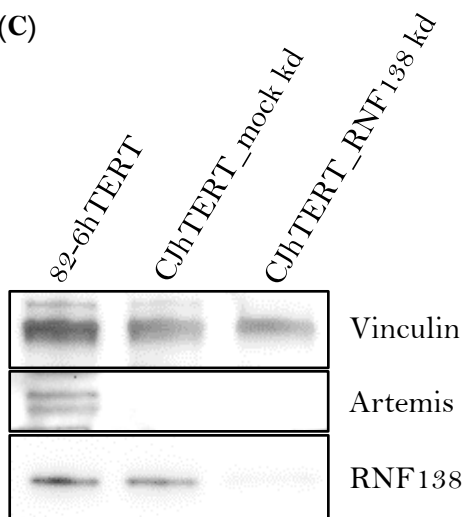
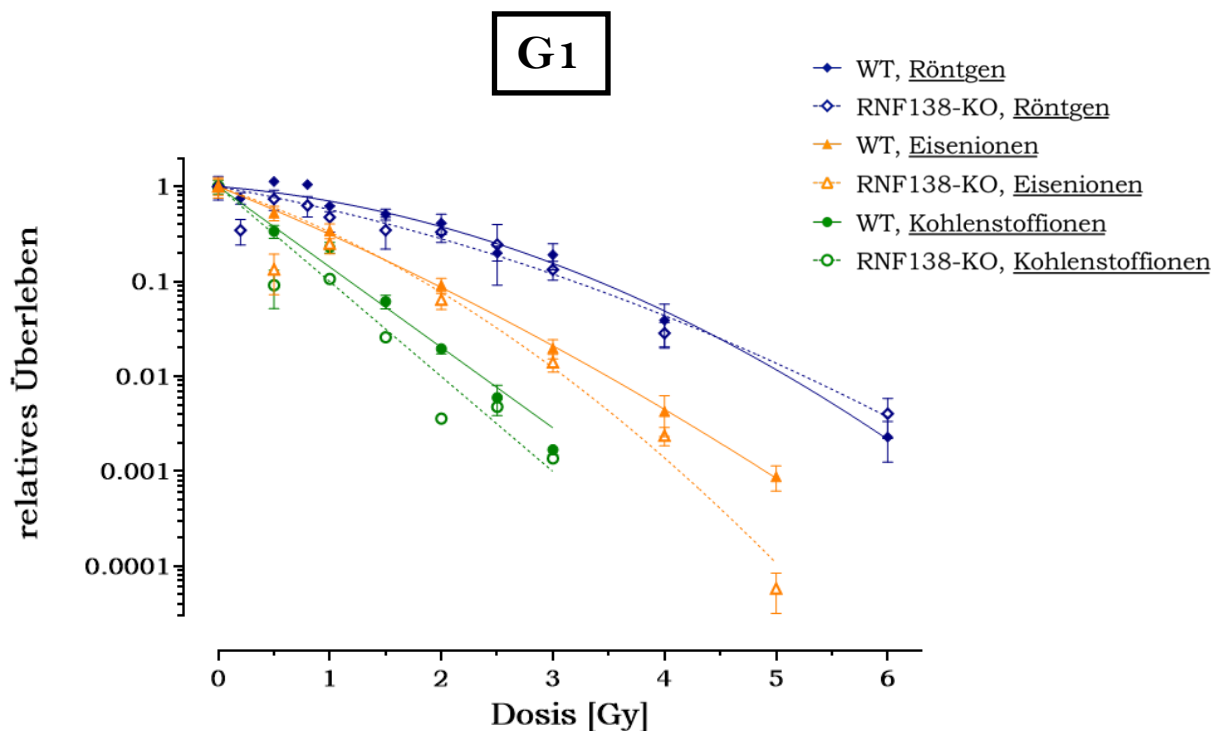


Abbildung 57: DSB-Reparaturdefekt nach Röntgenbestrahlung in Artemis-defizienten G1-Phase-Zellen kann durch zusätzlichen *Knockdown* von RNF138 aufgehoben werden. Humane Wildtyp-Fibroblasten (82-6hTERT) und Artemis-defiziente (CJhTERT) sowie Artemis-defiziente mit zusätzlichem siRNA-induzierten RNF138 kd wurden mit 2 Gy Röntgen (A) oder alpha-Teilchen (B) bestrahlt. 15 min, 4 h, 8 h, 16 h bzw. 24 h nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und immunhistochemisch gegen γ H2AX sowie CENP-F gefärbt. Nun wurde die verbleibende Anzahl an γ H2AX-Foci in mindestens 50 G1-Phase Zellkernen bestimmt. CENP-F diene als Zellzyklusmarker. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung ($SD = standard deviation$). Die Effizienz des RNF138 *Knockdowns* (50 nM RNF138 siRNA #1 und #2 für 48 h) wurde mittels Westernblot Analyse überprüft (C). Vinculin diene als Ladekontrolle der aufgetragenen Proteinmenge.

3.6.3. RNF138-defiziente Zellen reagieren im Vergleich zu WT-Zellen leicht sensitiver auf die Induktion komplexer Schäden durch Ionenbestrahlung

Abschließend sollte evaluiert werden, ob der beobachtete DSB-Reparaturdefekt in RNF138-KO-Zellen sich auch in Überlebensstudien widerspiegelt. Zur Analyse der zellzyklusspezifischen Radiosensitivität von RNF138-KO im Vergleich zu WT-Zellen nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenqualitäten wurde der etablierte Koloniebildungsassay angewendet (Franken, Rodermond *et al.* 2006) (vgl. Kapitel 2.2.1.4). Hela.S-Fucci-WT und -RNF138-KO-Zellen wurden gleichermaßen mit Dosen zwischen 0 Gy und 6 Gy Röntgen, 0 Gy und 5 Gy Eisenionen (SIS: Primärenergie 1 GeV/u; LET: 155 keV/μm) bzw. 0 Gy und 3 Gy Kohlenstoffionen (UNILAC: Primärenergie: 11,4 MeV/u; LET: 168 keV/μm) bestrahlt, direkt nach Bestrahlung am *Cell Sorter* in G1- und S/G2-Phase-Zellen unterschieden und bei ausreichend vorhandenen Zellen in Triplikaten für den Koloniebildungsassay ausgesät. Zwölf Tage später erfolgte die Methylenblaufärbung der Kolonien und die Bestimmung der Anzahl an Kolonien mit 50 oder mehr Zellen. Unbestrahlte Proben dienten als Kontrolle, auf die alle anderen Werte normiert wurden. Die Kurven der Röntgen- (blau) und Eisenionen-bestrahlten Zellen (orange) wurden linear-quadratisch gefittet (Formel 10 Kapitel 2.2.1.4), wohingegen Kohlenstoff-bestrahlte Proben (grün) linear gefittet wurden (Formel 11 Kapitel 2.2.1.4). Abbildung 58A zeigt die Ergebnisse der Überlebensstudien in G1-Phase-Zellen, wohingegen in Abbildung 58B jene in S/G2-Phase-Zellen dargestellt sind. Anhandessen ließ sich generell festhalten, dass RNF138-defiziente (gestrichelte Linien) Zellen beider Zellzyklusphasen nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen leicht sensitiver reagierten als WT-Zellen (durchgezogene Linien) (Abbildung 58A und Abbildung 58B). Im Fall der mit Eisenionen-bestrahlten Zellen war lediglich nach hohen Dosen ein minimaler Unterschied zwischen WT- und RNF138-KO-Zellen erkennbar. Nach Röntgenbestrahlung konnte keine Differenz zwischen G1-Phase WT- und RNF138-KOs ausgemacht werden. In S/G2-Phase-Zellen bildeten RNF138-KO-Zellen auch nach Röntgenstrahlung minimal weniger Kolonien als WT-Zellen, wobei der Effekt nach Induktion der komplexesten Schäden durch Kohlenstoffionenbestrahlung am offensichtlichsten war (Abbildung 58B).

(A)



(B)

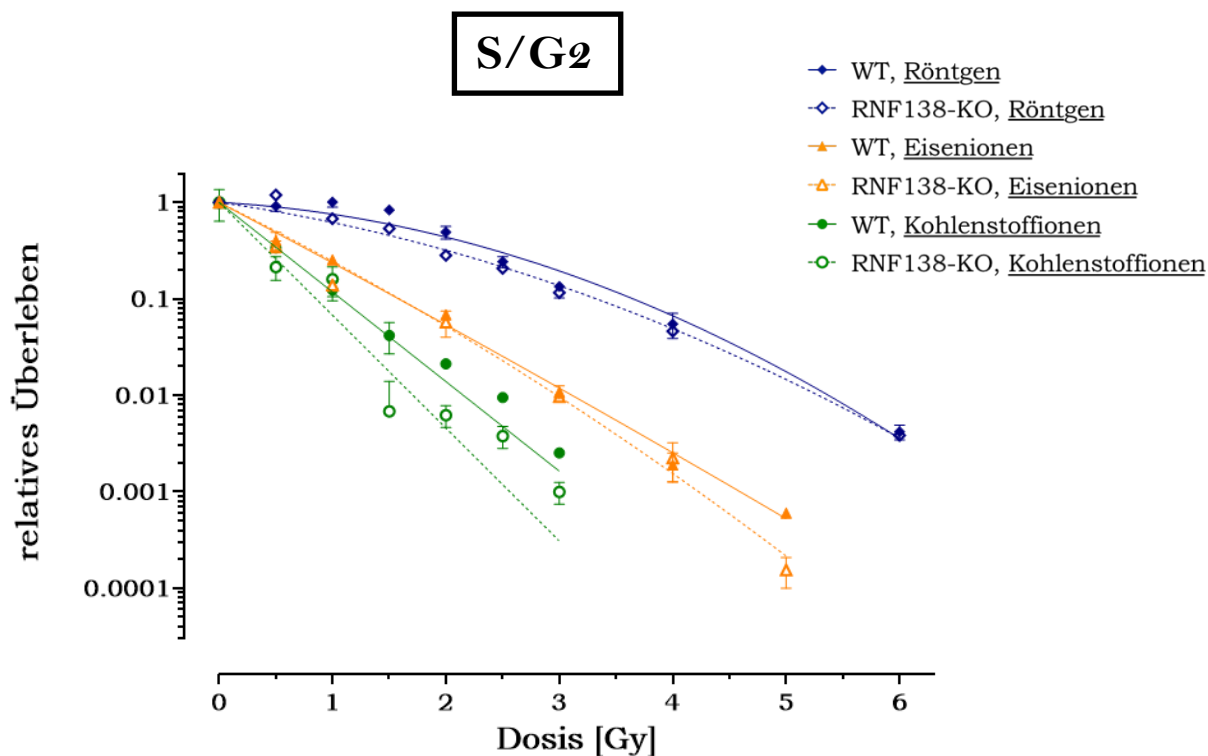


Abbildung 58. Vermindertes klonogenes Überleben in G1- und S/G2-Phase RNF138-KO- im Vergleich zu WT-Zellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen. HeLa.S-Fucci-WT (durchgezogene Linien) und HeLa.S-Fucci-RNF138-KO-Zellen (gestrichelte Linien) wurden mit Dosen von 0 bis 3 Gy Kohlenstoffionen (grün) am UNILAC (Primärenergie: 11,4 MeV/μm; LET: 168 keV/μm), 0 bis 5 Gy Eisenionen (orange) am SIS18 (Primärenergie: 1 GeV/u; LET: 155 keV/μm) bzw. 0 bis 6 Gy Röntgen (blau) (16 mA; 250 kV) bestrahlt, anschließend sortiert und spezifisch G1-Phase (A) bzw. S/G2-Phase-Zellen (B) ausgesät. 12 Tage später wurden die Kolonien mit 1x Methylenblau angefärbt, die Anzahl der Kolonien mit mehr als 50 Zellen gezählt und daraus das klonogene Überleben bestimmt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung ($SD = \text{standard deviation}$) aus Triplikaten. $n = 1$ für Röntgen S/G2, Eisen und Kohlenstoff; $n = 2$ für Röntgen G1; Fit: linear für Kohlenstoff. Fit: linearquadratisch für Röntgen und Eisen.

Tabelle 4 vergleicht die Dosis nach Bestrahlung mit den verschiedenen Strahlenqualitäten und Zellen der beiden Zellzyklusphasen in Präsenz oder Abwesenheit von RNF138, bei der noch 10% der Zellen überleben (D_{10}). Ebenfalls in Tabelle 4 dargestellt sind die bei dieser Dosis errechneten Werte der relativen biologischen Wirksamkeit (RBE), die sich aus dem Verhältnis des D_{10} -Werts der Ionenbestrahlung zur Referenzstrahlung Röntgen ergibt (vgl. Formel 5). Diese Werte bestätigten vorherige Beobachtungen. Die Dosis, bei der noch 10% der Zellen überlebten nahm von Röntgen- über Eisen- bis hin zur Kohlenstoffionenbestrahlung unabhängig der Zellzyklusphase ab. Damit einhergehend stieg der RBE mit steigender Schadenskomplexität sowohl in G1 als auch S/G2 an. Lediglich nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen war der RBE in RNF138-KO- im Vergleich zu WT-Zellen in beiden untersuchten Zellzyklusphasen entscheidend erhöht.

Zusammenfassend konnte demnach gesagt werden, dass sowohl DSB-Reparaturdefekte als auch Veränderungen der Überlebensfähigkeit in Zellen der G1-Phase nur nach Induktion komplexerer Schäden zu beobachten waren.

Tabelle 4: Vergleich der Dosis [Gy] bei 10% klonogenem Zellüberleben (D_{10}) und der relativen biologischen Wirksamkeit (RBE) nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenqualitäten.

Bestrahlung	G1				S/G2			
	WT		RNF138-KO		WT		RNF138-KO	
	D_{10}	RBE	D_{10}	RBE	D_{10}	RBE	D_{10}	RBE
Röntgen	3,41	1,00	3,19	1,00	3,65	1,00	3,32	1,00
Eisenionen	1,89	1,80	1,83	1,74	1,59	2,30	1,59	2,09
Kohlenstoffionen	1,68	2,03	1,00	3,19	1,08	3,38	0,85	3,91

Zur weiteren Charakterisierung der Überlebenskurven wurden die α - und β -Werte der Überlebensfits tabellarisch gegenübergestellt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Parameter der Überlebensfits: Vergleich der α - [Gy^{-1}] und β -Werte in [Gy^{-2}] nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenqualitäten. α - und β -Werte der Röntgen- und Eisenionenbestrahlung stammen vom linear-quadratischen Fit (vgl. Formel 10), wohingegen der α -Wert der Kohlenstoffionenbestrahlung vom linearen Fit (vgl. Formel 11) herrührt.

Bestrahlung	G1						S/G2					
	WT			RNF138-KO			WT			RNF138-KO		
	α	β	α/β	α	β	α/β	α	β	α/β	α	β	α/β
Röntgen	0,220	0,133	1,63	0,453	0,084	5,43	0,169	0,116	1,46	0,388	0,092	4,23
Eisenionen	1,076	0,068	15,95	0,909	0,184	4,95	1,427	0,017	85,13	1,328	0,073	18,31
Kohlenstoff- ionen	1,478	0,000		2,877	0,000		2,169	0,000		2,284	0,000	

Während α - und β -Werte der Röntgen- und Eisenionenbestrahlung vom linear-quadratischen Fit (vgl. Formel 10) herrühren, stammt der α -Wert der Kohlenstoffionenbestrahlung vom linearen Fit (vgl. Formel 11). Der β -Wert der Kohlenstoffionenbestrahlung ist aufgrund des linearen Verlaufes des Fits Null. Der α -Wert beschreibt die lineare Komponente, die Anfangssteigung des Fits, wohingegen der β -Wert, die quadratische Komponente, die Krümmung der Kurve widerspiegelt. Anhand des α -Werts kann auf die Sensitivität der Zellen nach Bestrahlung geschlossen werden. Je größer der α -Wert und damit einhergehend je steiler die Kurve, desto sensibler reagiert die Zelllinie auf die Bestrahlung.

Unabhängig der Zellzyklusphase oder dem Hintergrund einer RNF138-Defizienz stieg der α -Wert von Röntgen, über Eisen- bis hin zur Bestrahlung mit Kohlenstoffionen an (vgl. Tabelle 5). Der β -Wert hingegen spiegelt die Reparaturfähigkeit der Zellen wieder und wird oftmals über das Verhältnis des α -Werts zum β -Wert dargestellt (Iliakis 1980, Ando und Goodhead 2016). Je kleiner der β -Wert bzw. je größer das Verhältnis von α zu β , desto schlechter die Reparatur. Überlebenskurven nach Röntgen und Eisenionenbestrahlung wurden linearquadratisch gefittet und zeigten zumindest eine leichte Krümmung, weshalb in diesem Fall das Verhältnis des α -Werts zum β -Wert berechnet werden konnte. Hierbei zeigte sich nach Röntgenbestrahlung ein größerer Verhältniswert vom α - zum β -Wert, sprich eine bessere Reparaturfähigkeit der WT- im Vergleich zu den RNF138-defizienten Zellen. Der Vergleich der beiden Strahlenqualitäten ließ überwiegend einen größeren α/β -Quotient nach Eisenionenbestrahlung erkennen, was mit einer schlechteren Reparatur nach Bestrahlung mit Eisenionen im Vergleich zu Röntgen einhergeht. Für die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen konnte aufgrund des linearen Verlaufes des Fits, der mit einem β -Wert von Null und somit keinerlei Krümmung der Kurve einhergeht kein α/β -Quotient errechnet werden. Ebendarum war die Reparatur- und die damit einhergehende Überlebensfähigkeit nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen in WT- und RNF138-KO-Zellen schlechter als nach Röntgen- und Eisenionenbestrahlung. Der α -Wert, welcher unabhängig der Zellzyklusphase in RNF138-KO-Zellen größer war als in WT-Zellen, spiegelte höhere Sensitivität der RNF138-defizienten Zellen auf die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen wieder.

4. Diskussion

4.1. Ubiquitinierung – eine posttranslationale Modifikation zur Regulation der DNA-End-Resektion in der DNA-Schadensantwort

Posttranslationale Modifikationen wie Ubiquitinierungen sind chemische Veränderungen von Proteinen nach deren Translation und werden durch Enzyme katalysiert, die spezielle Zielsequenzen in Proteinen erkennen. Veränderungen von Proteinen über kovalente Bindung von kleinen Molekülen zählt zu den meist verbreiteten Modifikationen. Hierzu zählt auch die PTM durch Ubiquitinierung, bei der Ubiquitin in einem Prozess aus drei Schritten kovalent an ein Protein gebunden wird. Jeder dieser Schritte wird durch ein eigenes Enzym, bezeichnet als E1, E2 bzw. E3, katalysiert (vgl. Abbildung 10) (Ciechanover, Finley *et al.* 1984, Hershko und Ciechanover 1998). Auch in der DNA-Schadensantwort (*DNA damage response* = *DDR*) wurde die Proteinmodifikation durch Ubiquitinierung als Regulator beschrieben (Xie 2010, Brinkmann, Schell *et al.* 2015). Studien unter anderem in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Reparatur komplexer DSBs infolge von hoch-LET-Ionenbestrahlung unabhängig der Zellzyklusphase vermehrt resektionsabhängig verläuft (Yajima, Fujisawa *et al.* 2013, Averbeck, Ringel *et al.* 2014). Mit steigendem LET und demzufolge steigender Komplexität der induzierten DNA-Schäden war zunehmend Resektion zu beobachten (vgl. Abbildung 16 nach (Averbeck, Ringel *et al.* 2014)). DNA-End-Resektion ist insbesondere als Teilprozess der Rekombination bekannt, weshalb sich Studien der Resektionsregulation zumeist auf S/G2-Phase-Zellen konzentrieren, in der HR aufgrund des vorhandenen Schwesterchromatids erfolgen kann (Liu und Huang 2016, Paudyal und You 2016, Symington 2016). Trotz des Wissens, dass Resektion nach Induktion komplexer Schäden nach Ionenbestrahlung vermehrt auch in G1 auftritt, bleibt die Resektionsregulation bis heute in G1 wenig erforscht. Resektierte DNA-Schäden werden in G1 über alternative NHEJ-DSB-Reparaturmechanismen (vgl. Abbildung 14) (Wang, Wu *et al.* 2006, Iliakis, Murmann *et al.* 2015) oder über den von Prof. Löbrich und seinen Kollegen beschriebenen resektionsabhängigen klassischen Weg des NHEJ (vgl. Abbildung 15) (Biehs, Steinlage *et al.* 2017, Jeggo und Löbrich 2017, Löbrich und Jeggo 2017) repariert, die beide jedoch sehr fehlerbehaftet sind und daher die Wahrscheinlichkeit für Mutationen sowie chromosomale Aberrationen drastisch erhöhen.

Mehrere Studien konnten das antagonistische Zusammenspiel von 53BP1 (*p53-binding protein 1*) und des Brustkrebsgens 1 (BRCA1) bei der Regulation der DNA-End-Resektion zeigen (Bouwman, Aly *et al.* 2010, Bunting, Callen *et al.* 2010, Chapman, Sossick *et al.* 2012, Zimmermann, Lottersberger *et al.* 2013, Bakr, Kocher *et al.* 2016). Während 53BP1 im Komplex mit RIF1 (*Rap interacting factor 1*) Resektion entgegenwirkt, nimmt BRCA1 zusammen mit CtIP (*C-terminal binding protein interacting protein*) eine resektionsfördernde Rolle ein, wodurch die Wahl des Reparaturwegs maßgeblich beeinflusst wird (Bothmer, Robbiani *et al.* 2010, Chapman, Barral *et al.* 2013, Escibano-Diaz, Orthwein *et al.* 2013, Zimmermann, Lottersberger *et al.* 2013). BRCA1 selbst ist dafür bekannt über seine C-terminale Domäne CtIP zu phosphorylieren, woraufhin BRCA1s N-terminale RING-(*really interesting new gene*) Domäne die Ubiquitinierung des Resektionsfaktors CtIP katalysiert (Yu, Fu *et al.* 2006). Aber auch der Resektionsantagonist 53BP1 wird im Verlauf der DDR durch Ubiquitin-Ligasen posttranslational modifiziert und aktiviert (Bohgaki, Bohgaki *et al.* 2013, Hu, Wang *et al.* 2014), das die

Bedeutung von Proteinmodifikationen durch Ubiquitinierung für die DDR, aber auch die Wahl des Reparaturmechanismus und der Resektionsregulation unterstreicht.

Wie oben erwähnt ist über die Resektionsregulation in G1 wenig bekannt, jedoch konnte die Modifikation von Proteinen durch Ubiquitinierung mit der DDR sowie der DNA-End-Resektion in Verbindung gebracht werden. Wissenlich, dass nach Ionenbestrahlung Resektion auch in G1 vermehrt auftritt und die DSB-Reparatur sowie das Zellüberleben nach Ionenbestrahlung in G1-Zellen, in denen der Resektionsfaktor CtIP herunterreguliert wurde, maßgeblich beeinflusst wird, sollte in der vorliegenden Arbeit die Relevanz der Proteinubiquitinierung für die Resektionsregulation in G1 nach Induktion komplexer Schäden näher untersucht werden.

4.2. Funktion der Ubiquitin-Ligase RNF8 nach hoch-LET-Bestrahlung in G1 und Auswirkungen einer RNF8-Defizienz auf die DNA-End-Resektion

Hu, Wang *et al.* (2014) beschrieben die Wichtigkeit der beiden Ubiquitin-Ligasen RNF168 und RNF8 für die Regulation des Resektionsantagonisten 53BP1. Es konnte gezeigt werden, dass RNF8 und RNF68 nicht nur für die Ubiquitinierung 53BP1 an Lysin 1268 und jener von Histon H2A an Lysin 15 (H2AK15ub) als Voraussetzung für die Bindung von 53BP1 wichtig sind, sondern auch den proteosomalen Abbau von 53BP1 regulieren (Huen, Grant *et al.* 2007, Bohgaki, Bohgaki *et al.* 2013, Hu, Wang *et al.* 2014). Nach Ismail, Gagne *et al.* (2015) ist auch die Entfernung Ku80s in seiner Rolle als Resektionsantagonist entscheidend, um Resektion zu erlauben. Die Ubiquitin-Ligase, die beschrieben wird in G1 zu agieren und mit Ku80 zu interagieren, ist RNF8 (Ismail, Gagne *et al.* 2015). Auch Feng und seine Kollegen beschrieben die E3 Ubiquitin-Ligase RNF8 als Faktor, der den Verbleib des NHEJ-Proteins und Resektionsantagonisten Ku80 beeinflusst. Die Depletion von RNF8 führte in deren Untersuchungen zu einem Verbleib von Ku80 an der Schadenstelle und verringerter Reparatur von DSBs durch c-NHEJ (Feng und Chen 2012). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die E3 Ubiquitin-Ligase RNF8 und deren Stellenwert für die Resektion in G1 nach Induktion komplexer Schäden untersucht.

Ubiquitin-*Pulldown*-Analysen sortierter G1-Phase-Zellen zeigten einerseits deutlich, dass posttranslationale Proteinmodifikationen durch Ubiquitinierung in Folge komplexer Schäden nach Ionenbestrahlung vermehrt auftreten. Die siRNA-basierte Herunterregulation von RNF8 andererseits dämmte dieses zuvor beobachtet verstärkte Auftreten ubiquitinerter Proteine auf das Niveau unbestrahlter Zellen ein (vgl. Abbildung 33), was einen ersten Hinweis für die Bedeutung der E3 Ubiquitin-Ligase RNF8 und eine mögliche Beteiligung dieser an der DDR in G1 nach Induktion komplexer Schäden lieferte. Im Hinblick auf die mögliche Resektionsbeteiligung von RNF8 wurden ebenfalls RNF8 depletierte humane Zellen (U2OS-Zellen) verwendet und die Anzahl an RPA-Foci als Resektionsmarker ausgewertet. Trotz des nicht vorhandenen Unterschieds auf RPA-Foci-Level zwischen RNF8 pro- und defizienten Zellen nach Induktion komplexer Schäden durch alpha-Teilchen-Bestrahlung (vgl. Abbildung 34A), konnte eine Beteiligung RNF8s anhand dessen nicht zwangsläufig ausgeschlossen werden. Denn die Depletion von 53BP1 wirkte sich positiv auf die Resektion aus (vgl. Abbildung 35B), was im Einklang mit diversen anderen Studien steht (Dissertation Tatyana Syzonenko 2017 Abbildung 4.5B) (Chapman, Barral *et al.* 2013, Escribano-Diaz, Orthwein *et al.* 2013, Zimmermann, Lottersberger *et al.* 2013). Veröffentlichungen beschreiben eindeutig die Auswirkungen von RNF8 auf die Rekrutierung von 53BP1

und dessen antagonistische Wirkungsweise bzgl. des Prozessierens von DNA-Enden. Möglicherweise wirkt sich die Depletion von RNF8 negativ auf die Resektion aus, konnte jedoch durch Auszählung von RPA-Foci nicht dargestellt werden, da der *Knockdown* der Ubiquitin-Ligase RNF8 die Rekrutierung von 53BP1 drastisch negativ beeinflusst, wie in Abbildung 34B verifiziert werden konnte, das wiederum die Resektion begünstigt (vgl. Abbildung 35). So könnte es sich um gegenläufige Effekte handeln, die sich in Summe aufheben und durch RPA-Foci-Analysen in RNF8-defizienten Zellen nicht differenziert werden können.

4.3. Relevanz der Ubiquitin-Ligase RNF138 für die DNA-End-Resektion in humanen G1-Phase-Zellen nach Ionenbestrahlung

Wie zuvor bereits erwähnt, ist die Entfernung Ku80s in seiner Rolle als Resektionsantagonist entscheidend, um Resektion zu erlauben (Ismail, Gagne *et al.* 2015). Während in G1 RNF8 beschrieben wird mit Ku80 zu interagieren, ist nach Ismail, Gagne *et al.* (2015) in S/G2-Phase-Zellen die Ubiquitin-Ligase RNF138 dafür verantwortlich Ku80 zu ubiquitinieren, um die Ablösung des Resektionsantagonisten vom Schaden zu ermöglichen. Zudem beschreiben Schmidt, Galanty *et al.* (2015) dieselbe Ubiquitin-Ligase, RNF138, für die Ubiquitinierung des Resektionsfaktors CtIP und dessen Rekrutierung an DSBs entscheidend zu sein. Zusammenfassend kann demnach festgehalten werden, dass diese beide Studien eine Ubiquitin-Ligase ausfindig machen konnten, die unabhängig von RNF8 und RNF168 die Wahl des Reparaturwegs beeinflusst, indem HR über den Prozess der Resektion stimuliert wird (Bekker-Jensen und Mailand 2015). Da nach hoch-LET-Bestrahlung nicht nur in S/G2, sondern auch in G1 vermehrt DNA-Enden prozessiert und resektiert werden (Averbeck, Ringel *et al.* 2014), wurde folglich in dieser Arbeit eine Beteiligung von RNF138 in G1 nach Induktion komplexer Schäden genauer betrachtet.

Die Grundvoraussetzung hierfür lieferte in Abbildung 36 dargestellte zellzyklusabhängige Expressionsanalyse des Proteins RNF138, die eine vergleichbare RNF138-Expression in G1- und G2-Phase-Zellen zeigte. Erste Resektionsanalysen nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen (Primärenergie: 6,5 MeV/u; LET: 325 keV/μm) in humanen Fibroblasten (NFFhTERT) ließen nach siRNA-induzierter RNF138-Depletion einen reduzierten Anteil an RPA-positiven Zellen um 24% in G1 und um 10% in S/G2 erkennen. Für die Zellzyklusphasen S/G2, in denen resektionsabhängige Reparatur über HR stattfinden kann, bestätigte dies bereits veröffentlichte Daten von Ismail, Gagne *et al.* (2015) sowie Schmidt, Galanty *et al.* (2015). Als wichtiger Bestandteil der Resektion für die DSB-Reparatur über Rekombination wirkt sich eine Herunterregulation der Ubiquitin-Ligase RNF138 auf die gesamte HR-Maschinerie aus, weshalb die Effizienz des RNF138 kd in diesem Fall über einen signifikant geringeren Anteil an Rad51-positiven Zellen bestätigt werden konnte (vgl. Abbildung 42B). Rad51 ist für den Prozess der Homologiesuche und der Stranginvasion während der HR essentiell, indem es eine Verbindung zwischen der einzelsträngigen DNA des beschädigten Chromatids und dem homologen doppelsträngigen Bereichs eines Schwesterchromatids herstellen kann (West 2003). Die negativen Auswirkungen einer RNF138-Defizienz auf die Rekrutierung von Rad51 als wesentlicher Bestandteil der HR entsprechen ebenfalls der Literatur (Han, Liang *et al.* 2016, Yard, Reilly *et al.* 2016).

Im Fall eines siRNA-basierten *Knockdowns* wird ein spezielles Gen gehemmt, indem kurze, meist 20 nt lange, RNA-Sequenzen, sog. siRNAs (*small interfering RNA*), genutzt werden, um die mRNA (*messenger RNA*) eines

speziellen Genes zu inaktivieren. Der *Knockdown* eines Gens ist somit ein transientes Ereignis, das zu einer temporären Änderung der Gen- und Proteinexpression eines zuvor aktiven und funktionalen Gens/Proteins führt. Im Fall des CRISPR/Cas9-*Knockouts* können einzelne Gene gezielt so verändert werden, dass Genmutationen dazu führen, dass das Protein nicht mehr translatiert werden kann. Diese Genveränderung führt zu einer kompletten Ausschaltung des Gens und folglich der Proteinexpression und ist somit permanent, zumeist effektiver als ein *Knockdown* mittels siRNA und bietet den Vorteil einer höheren Reproduzierbarkeit, ist jedoch aufwändiger zu generieren. Mit dem Wissen, dass homozygoten RNF138-*Knockout*-Mäuse lebensfähig sind und der *Knockout* nicht embryonal lethal ist (Xu, Lu *et al.* 2017), wurden zwei humane RNF138-*Knockout*-Zelllinien hergestellt. Dies erleichterte die Funktionsanalyse dieser Ubiquitin-Ligase und machte die Untersuchungen zudem vergleichbarer, da keine Unterschiede im RNF138-Proteinexpressionslevel die Ergebnisse beeinflussen. Proteinexpressionsanalysen einerseits (vgl. Abbildung 37), Sequenziererergebnisse (vgl. Anhang 1 und Anhang 2) andererseits und die Überprüfung der Zygotität mittels Cas9-Nuklease-Reaktion (vgl. Abbildung 38) bestätigten den homozygoten RNF138-*Knockout* in beiden Zelllinien. Dass auch der *Knockout* der Ubiquitin-Ligase RNF138 in der Lage war die strahlungs- und LET-abhängige verstärkt auftretende Modifikation von Proteinen durch Ubiquitinierung in G1 einzudämmen, belegten Analysen der neu generierten RNF138-KO- im Vergleich zu WT-Zellen mittels Ubiquitin-*Pulldown* in sortierten G1-Phase Zellen (vgl. Abbildung 40). Verglichen mit den bereits zuvor erwähnten Ubiquitin-Analysen in RNF8 kd Zellen, war der Effekt in RNF138-defizienten Zellen vergleichbar. Die simultane Ausschaltung beider Ubiquitin-Ligasen ließ keinen additiven Effekt erkennen, dennoch war die Reduktion nach doppelter Depletion und Bestrahlung mit Eisenionen am größten. Dies rechtfertigt die Annahme, dass beiden Faktoren im selben Weg aktiv sein könnten, dennoch möglicherweise die Defizienz einer der beiden Ubiquitin-Ligasen zum Teil durch die Aktivität der anderen kompensiert werden kann.

RPA-Foci-Analysen nach siRNA-basiertem *Knockdown* von RNF138 zeigten, wie zuvor bereits erwähnt, eine Reduktion des Anteils an resektionspositiven Zellen beider Zellzyklusphasen in RNF138-defizienten Zellen (vgl. Abbildung 42A). Erste Untersuchungen in den neu generierten RNF138-KO-Zellen ließen auf Proteinebene zellzyklusunabhängig ein verringerte Phosphorylierung von RPA nach Bestrahlung mit 30 Gy Röntgen erkennen, was zum einen die Funktionalität des RNF138-KO und zum anderen die Relevanz für die Resektion weiter untermauerte (vgl. Abbildung 41). Das Wiederholungsexperiment der RPA-Foci-Analyse nach Kohlenstoffionenbestrahlung (Primärenergie: 6,5 MeV/u; LET: 325 keV/μm) in U2OS-RNF138-KO- im Vergleich zu U2OS-WT-Zellen bestätigte zuvor beobachtete Ergebnisse eines reduzierten Anteils an RPA-positiven Zellen in beiden Zellzyklusphasen. Mit 50% weniger resektionspositiven Zellen in G1 und knapp 38% Reduktion in S/G2 war der Effekt in den RNF138-KO-Zellen im Gegensatz zu dem mittels siRNA erzeugten RNF138 kd deutlicher und in G1-Zellen signifikant (vgl. Abbildung 42). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der komplette *Knockout* von RNF138 effektiver war als der siRNA-induzierte *Knockdown*. Dennoch gilt zu beachten, dass es sich bei U2OS-Zellen um eine humane, karzinogene Osteosarkomzelllinie handelt und bei NFFhTERT-Zellen um humane, normale Fibroblasten, die möglicherweise unterschiedlich stark auf die Ubiquitin-Ligase angewiesen sind bzw. deren Reparatur nicht vergleichbar oft resektionsabhängig verläuft. Betrachtet man beispielsweise Resektionsstudien von Auerbeck, Ringel *et al.* (2014) nach Bestrahlung mit

Titanionen (^{48}Ti ; UNILAC: Primärenergie 11.4 MeV/u; LET: 2180 keV/ μm) in U2OS- im Vergleich zu NFFhTERT-Zellen, war der Anteil an RPA-positiven Zellen sowohl in S/G2 als auch G1 in genau diesen Tumor-U2OS-Zellen höher als in den auch in dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten (NFFhTERT). Tumorzellen weisen im Gegensatz zu Normalzellen eine höhere Proliferationsrate auf und befinden sich daher häufiger in Zellzyklusphasen, in denen DSBs über HR repariert werden (Chernikova, Game *et al.* 2012). Dies wird sich in der Tumorthherapie häufig zunutze gemacht. Des Weiteren wird auch ein erhöhtes Expressionslevel an Faktoren alternativer, resektionsabhängiger NHEJ-DSB-Reparaturwege mit einem erhöhten Risiko für Brust-, Ovarial und anderen Krebsarten in Verbindung gebracht. Im Gegensatz zu Rekombinationsproteinen sind zuvor erwähnte Faktoren alternativer, resektionsabhängiger NHEJ-Reparaturwege, wie beispielsweise die Polymerase θ , während des des kompletten Zellzyklus aktiv (Thompson 2012) und werden als Target für die Tumorthherapie gehandelt (Wood und Doubie 2016, Chang, Pannunzio *et al.* 2017). Diese in der Literatur veröffentlichten Erkenntnisse bekräftigen die Bedeutsamkeit resektionsabhängiger DSB-Reparaturmechanismen für entartete Tumorzellen und stellen neben der unterschiedlichen Art und Weise der erzielten RNF138-Defizienz und der immer zu beachtenden biologischen Varianz eine weitere, mögliche Erklärung der beobachteten Unterschiede zwischen den beiden analysierten Zelllinien dar.

Wie zuvor bereits beschrieben ist die Ubiquitinierung ein mehrstufiger Prozess mehrerer Faktoren bestehend aus einem aktivierenden Enzym E1, einem konjugierenden Enzym E2 und der E3 Ubiquitin-Ligase (Huang und D'Andrea 2006). Da erstens zuvor die Bedeutung der E3 Ubiquitin-Ligase RNF138 für die Resektion gezeigt werden konnte und zweitens nach Schmidt, Galanty *et al.* (2015) für S/G2 das E2 konjugierende Enzym UBE2D1 als Partner von RNF138 beschrieben wurde, sollte untersucht werden, ob UBE2D1 auch in G1 als konjugierendes Enzym (E2) zur E3 Ubiquitin-Ligase RNF138 agiert. Hierfür wurden nach siRNA-induziertem *Knockdown* von UBE2D1 die Resektion mittels RPA-Foci-Analyse untersucht. Diese Versuche ließen einen negativen Einfluss des UBE2D1 kd in S/G2-Phase-Zellen die Resektion erkennen, was die erwähnte Verbindung von UBE2D1 und RNF138 in Zellen dieser Zellzyklusphase unterstützt (vgl. Abbildung 43). In G1-Phase-Zellen hingegen konnte kein Unterschied an RPA-positiven Zellen ausgemacht werden (vgl. Abbildung 43). Dies weist darauf hin, dass UBE2D1 in G1 nicht als E2 konjugierendes Enzym zu RNF138 fungiert.

Alles in allem konnten die Wichtigkeit der Ubiquitin-Ligase RNF138 für die Resektion nicht nur in S/G2, sondern auch in G1 herausgestellt werden. Resektionsanalysen zeigten nach RNF138-Depletion und Induktion komplexer Schäden unabhängig der untersuchten Zellzyklusphase einen verringerten Anteil an RPA-positiven Zellen. Die Tatsache, dass die Resektion in RNF138-defizienten Zellen nicht komplett eingedämmt war, lässt jedoch darauf schließen, dass neben RNF138 weitere Faktoren in der Resektionsregulation sowohl in G1 als auch S/G2 involviert sind.

4.4. Einfluss des Resektionsantagonisten Ku80 – Zielprotein der Ubiquitin-Ligase RNF138 – auf die DNA-End-Resektion nach Induktion komplexer Schäden in G1

Die im vorherigen Kapitel diskutierten Ergebnisse belegten eindeutig die Bedeutsamkeit der E3 Ubiquitin-Ligase RNF138 für die Resektion nicht nur in S/G2, sondern auch in G1 nach Induktion komplexer Schäden. Nach dem von Bekker-Jensen und Mailand (2015) veröffentlichten Schema, das die resektionsvermittelnde Funktion von RNF138 für die DSB-Reparatur über HR aufzeigt, sind hierfür zwei Funktionen der Ubiquitin-Ligase entscheidend. Nach diesem Modell, das sich hauptsächlich auf die beiden Publikationen von Ismail, Gagne *et al.* (2015) sowie Schmidt, Galanty *et al.* (2015) stützt, binden Ku und der MRN-Komplex nach Induktion eines DSB unabhängig an die entstandenen DNA-Enden. Der MRN-Komplex ist dafür verantwortlich kurze resektierte Bereiche zu generieren, an denen der Komplex aus RNF138-UBE2D1 über die ZNF- (*zinc finger*) Domäne von RNF138 an die DNA binden kann. Anschließend wird der Resektionsantagonist Ku80 durch RNF138 modifiziert, was zu Ku80s Ablösung vom Schaden führt und exzessivere Resektion für die Rekombination erlaubt (Ismail, Gagne *et al.* 2015). Des Weiteren ist ebenfalls RNF138 in S/G2 dafür verantwortlich den Resektionsfaktor CtIP zu ubiquitinieren und so dessen Rekrutierung an den DSB zu fördern (Schmidt, Galanty *et al.* 2015). Beide dieser erwähnten Schritte finden *upstream*, sprich vor der Bindung von RPA an die entstandenen einzelsträngigen Bereiche der DNA, statt. Demzufolge sind das Ablösen Ku80s vom Schaden und die Rekrutierung des Resektionsfaktors CtIP Abläufe, die die anschließende Bindung des Einzelstrangbindepoteins RPA an die DNA beeinflussen können, wenn sie gar nicht oder fehlerhaft ablaufen. Im Hinblick darauf, die Regulation der Resektion in G1 besser zu verstehen, sollten daher nun die beiden für S/G2 in der Literatur beschriebenen Möglichkeiten auf die Resektion einzuwirken in G1 nach Induktion komplexer Schäden genauer untersucht werden.

Unveröffentlichte Daten von Tatyana Syzonenko in murinen, embryonalen Fibroblasten (MEF-Zellen) im Vergleich zu Ku80-defizienten Mausfibroblasten (MEF Ku80^{-/-}) konkretisierten eine resektionsunterdrückende Funktion von Ku80 nach Ionenbestrahlung in beiden Zellzyklusphasen, indem sie eine Zunahme an Resektions-(RPA-) positiven Zellen 1 h nach Bestrahlung mit Uranionen (²³⁸U; LET: 15000 keV/μm; Fluenz: 3 x 10⁷) in G2 von ca. 65% in WT- auf etwa 85 % in Ku80-defizienten Zellen um knapp 20% und in G1 von ca. 25% in WT- auf etwa 70% in Ku80-defizienten MEFs nachweisen konnte. Deshalb wurde zunächst die Option des Ablösens des Resektionsantagonisten Ku80 als stimulierender Faktor für exzessivere Resektion in G1 nach Induktion komplexer Schäden analysiert.

4.4.1. Bedeutung der ATPase p97/VCP für die Resektion komplexer Schäden in G1

Nach van den Boom, Wolf *et al.* (2016) wird ubiquitiniertes Ku80 durch die AAA-ATPase VCP/p97 vom Schaden entfernt und schlussendlich proteosomal abgebaut. VCP/p97 gehört zur Familie der AAA- (*ATPase-associated with various cellular activities*) ATPasen und ist in der Zelle reichlich vorhanden (Stolz, Hilt *et al.* 2011). Durch dessen Vorkommen in der Nähe des Proteasoms werden durch VCP/p97 Proteine entfaltet und deren Transport in die proteolytische Kammer gefördert. Um zu überprüfen, ob Ku80 auch in G1 nach Induktion

komplexer Schäden ein Target der AAA-ATPase VCP/p97 ist und so die Resektion beeinträchtigt wird, wurde die Funktion der ATPase mittels des allosterischen Inhibitors NMS-873 unterbunden und anschließend die Resektion in Form von RPA-Foci analysiert. NMS-873 wurde von Magnaghi, D'Alessio *et al.* (2013) als enorm wirksamer Inhibitor von VCP/p97 beschrieben und dessen Funktionalität und effektivste Konzentration von 50 μ M bestätigte das in Abbildung 46 dargestellte Vorexperiment der Analyse von phosphoryliertem RPA mittels Westernblot. Dieses Vorexperiment zur Ermittlung der effektivsten NMS-873-Konzentration ließ nach einer einstündigen Inkubation mit 50 μ M NMS-873 und anschließender Bestrahlung mit 30 Gy Röntgen eine drastische Reduktion der Phosphorylierung von RPA 1 h nach Bestrahlung erkennen (Abbildung 46), weshalb diese Konzentration an NMS-873 in den folgenden RPA-Foci-Analysen zur Ermittlung einer möglichen VCP/p97-Funktion bei der Resektionsregulation eingesetzt wurde. Die Resektionsanalyse nach NMS-873-Behandlung und Bestrahlung mit alpha-Teilchen zur Induktion komplexer DSBs zeigte zwar eine Reduktion der durchschnittlichen Anzahl an RPA-Foci pro Zellkern in beiden Zellzyklusphasen, jedoch war dieser Effekt nicht signifikant (vgl. Abbildung 47). Dies lieferte dennoch einen ersten Hinweis darauf, dass möglicherweise Ku80 nach Inhibition von VCP/p97 nicht vom Schaden entfernt werden kann und sich dieser Verbleib Ku80s am Schaden somit negativ auf die Resektion auswirkt. Begleitend bestätigte die Interaktionsanalyse, die in Abbildung 48 aufgezeigt ist, dass Ku80 mit VCP/p97 auch in G1-Zellen interagiert. Da die Interaktion jedoch nicht strahlungsabhängig war, liegt die Vermutung nahe, dass weitere Faktoren involviert sein könnten. Dantuma, Acs *et al.* (2014) fassten in ihrem Review die Bedeutung von VCP/p97 für die Extraktion von Proteinen an DSBs, aber auch für die Reparatur UV-induzierter Schäden über NER (*nucleotide excision repair*) oder TLS (*translesion synthesis*) zusammen, das die weitreichende Funktionalität der ATPase erkennen lässt. Mit Fokus auf DSBs wird VCP/p97 beschrieben, über die Achse der Ubiquitin-Liase RNF8 und RNF168 Einfluss auf die Wahl des Reparaturwegs zu nehmen, indem es beispielsweise die Rekrutierung von 53BP1 reguliert (Acs, Luijsterburg *et al.* 2011, Meerang, Ritz *et al.* 2011). VCP/p97 konnte aber auch direkt mit der DNA-End-Resektion über andere Proteine wie RYBP in Verbindung gebracht werden. RYBP (*Ring1-YY1-binding protein*) ist als Transkriptionsregulator bekannt und wird nach Ali, Strickfaden *et al.* (2018) durch RNF8 K48-polyubiquitiniert und infolge dessen durch VCP/p97 vom DNA-Schaden entfernt. Somit wirkt ein hohes Expressionslevel an RYBP der Rekrutierung von BRCA1 und dem Prozess der Resektion sowie der Reparatur über HR entgegen (Ali, Strickfaden *et al.* 2018).

All diese Veröffentlichungen demonstrieren das breite Wirkungsspektrum der ATPase VCP/p97, was eine Aussagekraft des Einflusses von VCP/p97 auf die Resektion über den Resektionsantagonisten Ku80 schwierig macht, da viele andere Prozesse, auch Resektion, durch die Inhibition der ATPase auch über andere Proteine als Ku80 beeinflusst werden. In Abbildung 47 und Abbildung 48 dargestellte Ergebnisse stellen daher nicht mehr als ein Hinweis dar, dass möglicherweise auch in G1 der Verbleib Ku80s am Schaden die Ursache für die zuvor beobachteten negativen Auswirkungen auf die Resektion sein könnte.

4.4.2. Auswirkungen der DNA-PK-Inhibition zu späten Zeitpunkten nach Bestrahlung auf die DNA-DSB-Reparatur ioneninduzierter DSBs

Das Ku-Heterodimer ist zusammen mit der katalytischen Untereinheit DNA-PKcs Teil der DNA-abhängigen Proteinkinase, DNA-PK (*DNA-PK = DNA-dependent protein kinase*) (Smith und Jackson 1999). Die Autophosphorylierung von DNA-PKcs in Abhängigkeit von Ku ist für die Reparatur von DSBs von entscheidender Bedeutung (Chan, Chen *et al.* 2002). Daher stellt die Inhibition der DNA-PK und Analyse der DSB-Reparatur über den etablierten γ H2AX-Foci-Assay (Löbrich, Shibata *et al.* 2010) eine Möglichkeit dar die Rolle des Resektionsantagonisten Ku80 zu studieren und könnte in diesem Fall Aufschluss über die Entfernung oder den Verbleib Ku80s am Schaden geben. Eine beeinträchtigte DSB-Reparatur nach DNA-PK-Inhibition würde auf einen Verbleib Kus am Schaden hindeuten, wohingegen keinerlei Unterschied der Anzahl an verbleibenden γ H2AX-Foci zwischen WT- und DNA-PK-inhibierten Zellen zu späten Zeitpunkten nach Bestrahlung darauf schließen ließe, dass Ku bereits vom Schaden entfernt wurde. Da die DNA-PK ein wesentlicher Bestandteil der schnellen Reparaturkomponente über c-NHEJ darstellt, ist hierbei der Zeitpunkt der Inhibitor-Zugabe nach Bestrahlung entscheidend. Ziel ist es nämlich, nicht den Weg des schnell ablaufenden, resektionunsabhängigen c-NHEJ zu inhibieren, sondern lediglich langsame, spät ablaufende resektionsabhängige Wege in G1. Biehs, Steinlage *et al.* (2017) wählten zu diesem Zweck den Zeitpunkt der Zugabe des DNA-PK-Inhibitors NU7441 ab 6 h nach Bestrahlung mit 7 Gy Röntgen und analysierten die verbleibenden DSBs in G1 14 h nach deren Induktion. Eigene, in dieser Arbeit nicht dargestellte, Vorexperimente in DNA-PK-inhibierten U2OS-Zellen konnten die von Biehs, Steinlage *et al.* (2017) veröffentlichte Ergebnisse in Fibroblasten (82-6 hTERT) verifizieren. Die Zugabe von 7,5 μ M NU7441 6 h nach Bestrahlung führte zu einer signifikant schlechteren DSB-Reparatur in G1 10 h nach Bestrahlung mit 7 Gy Röntgen, was dafür spricht, dass die langsame Reparaturkomponente nach Induktion weniger komplexer Schäden, wie nach Röntgenbestrahlung, zu späten Zeiten DNA-PK-abhängig und somit in Gegenwart von Ku80 abläuft (Biehs, Steinlage *et al.* 2017). Abbildung 59 modifiziert nach Löbrich und Jeggo (2017) vergleicht Reparaturkinetiken in G1 und G2 nach Röntgen und Induktion komplexer Schäden durch alpha-Teilchen.

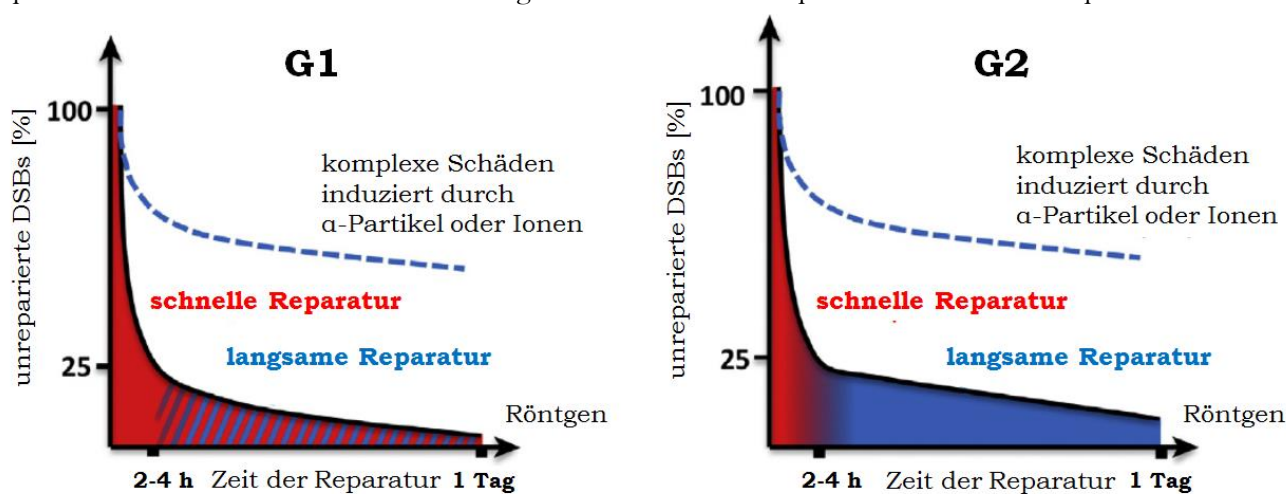


Abbildung 59: Schematische Darstellung von DSB-Reparaturkinetiken induziert durch niedrig-LET-Strahlung wie Röntgen (durchgezogene Linie) bzw. hoch-LET-Strahlung wie alpha-Teilchen oder Ionenbestrahlung (gestrichelte Linie) in der G1- (links) und G2-Zellzyklusphase (rechts) (modifiziert nach Löbrich und Jeggo 2017).

Sie verdeutlicht, dass der resektionunsabhängige klassische Weg des NHEJ (c-NHEJ) in allen Zellzyklusphasen und nach Induktion DSBs verschiedener Komplexität der am häufigsten verwendete DSB-Reparaturweg ist und schnell innerhalb von 2-4 h nach Bestrahlung vonstattengeht. Die langsame, späte Reparaturkomponente ist in G2 noch langsamer als in G1 und spiegelt Rekombination wieder, wohingegen in G1 die langsame Komponente alternative Wege des NHEJ sowie resektionsabhängige Reparatur über c-NHEJ darstellen. Nach Induktion komplexer Schäden nach hoch-LET-Bestrahlung, wie alpha-Teilchen oder Ionen, wird der Hauptteil der DSBs in beiden Zellzyklusphasen immer noch resektionunsabhängig über c-NHEJ repariert (Gerelchuluun, Manabe *et al.* 2015), jedoch nimmt die resektionsabhängige, langsame Reparaturkomponente mit zunehmender Komplexität einen höheren Stellenwert ein (Shibata, Conrad *et al.* 2011, Tommasino, Friedrich *et al.* 2013, Averbeck, Topsch *et al.* 2016). Das Level an verbleibenden unreparierten DSBs bleibt nach hoch-LET-Bestrahlung auch nach etwa einem Tag sehr viel höher im Vergleich zu niedrig-LET-bestrahlung wie Röntgen (Wang, Wang *et al.* 2008). Die Herausforderung lag nun darin den Zeitpunkt der DNA-PK-Inhibition nach hoch-LET-Bestrahlung so zu wählen, dass der Weg des unabhängig von Resektion ablaufenden c-NHEJ nicht angesprochen wird, resektionsabhängige Wege in G1 jedoch möglichst früh inhibiert werden, sodass schlussendlich noch ein Unterschied zu nicht-DNA-PK-inhibierten Zellen, die ebenfalls nur sehr langsam und wenig reparieren, ausgemacht werden kann. Daher wurde NU7441 3 h bzw. 4 h nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen (Primärenergie: 11.4 MeV/u; LET 168 keV/μM; Fluenz: 5 x 10⁶ T./cm²) zugegeben und die verbleibende Anzahl an γH2AX-Foci 10 h nach Bestrahlung evaluiert. Erfahrungswerte unserer Arbeitsgruppe demonstrierten, dass zwischen 10 h und 24 h nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen am UNILAC kaum noch DSBs repariert werden. Da die Vorexperimente bestätigten, dass die Inhibition der DNA-PK bis 10 h nach Bestrahlung aufrechterhalten werden konnte, rechtfertigte dies die Entscheidung die Evaluation der γH2AX-Foci 10 h nach Bestrahlung durchzuführen. Die Effizienz des DNA-PK-Inhibitors wurde durch dessen Zugabe 15 min nach Bestrahlung und demzufolge Inhibition der DNA-PK-, resektionunsabhängigen Reparatur über c-NHEJ bestätigt; sowohl in WT- als auch RNF138-KO-Zellen konnte 10 h nach Bestrahlung eine signifikant höhere Anzahl an verbleibenden DSBs im Vergleich zu unbehandelten Zellen festgestellt werden (vgl. Abbildung 45 orangene Linie). Die Auswertung der DSB-Reparatur in DNA-PK-inhibierten Zellen 3 h (grüne Linie) bzw. 4 h (rote Linie) nach Bestrahlung hingegen zeigte weder in WT- noch in RNF138-KO-Zellen einen Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (vgl. Abbildung 45). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass nach DNA-PK-Inhibition zu späten Zeitpunkten keine Beeinträchtigung der DSB-Reparatur zu verzeichnen war, da Ku80 bereits vom Schaden abgelöst wurde und eine Inhibition somit keine Auswirkungen mehr hatte. Bei genauerer Betrachtung der Daten ist jedoch auffällig, dass auch die unbehandelten Kontrollproben zwischen 3 h und 10 h, sprich dem frühesten Zeitpunkt der DNA-PK-Inhibitor Zugabe und der Evaluation der verbleibenden γH2AX-Foci am Ende, kaum DSBs reparierten, wodurch der Raum einen DSB-Reparaturdefekt nach DNA-PK-Inhibition nachzuweisen nicht ausreichend gegeben war. Dementsprechend konnte anhand dieser Ergebnisse schlussendlich keine Aussage über den tatsächlichen Verbleib oder das Ablösen Ku80s vom Schaden in G1 nach Ionenbestrahlung getroffen werden.

4.4.3. Entfernung des Resektionsantagonisten Ku80 vom Schaden unabhängig der Präsenz von RNF138 nach Ionenbestrahlung

Mit Hilfe indirekter Verfahren war es zuvor nicht möglich eine zuverlässige Aussage über das Ablösen oder den Verbleib des Resektionsantagonisten Ku80 am Schaden in G1 zu treffen. Daher wurde im Folgenden die Immunfluoreszenzfärbung gegen Ku80 etabliert. Als Grundlage diente das Protokoll von Britton, Coates *et al.* (2013). Das Ku-Protein beschreibt den Proteinkomplex bestehend aus den beiden heterodimerisierten Untereinheiten Ku70 und Ku80, die einen Hohlraum und somit Platz für die DNA bieten (Walker, Corpina *et al.* 2001). Im Zuge der Etablierung der Immunfluoreszenzfärbung gegen Ku80 zeigten Britton und seine Kollegen, dass ein Ku-Fokus aus durchschnittlich zwei Ku-Molekülen, besteht, von denen vermutlich eines an jede Seite des DSB gebunden wird. Die Größenvermessung der Ku-Foci mittels STED ließ eine Größe der Foci von unter 80 nm vermuten, was die vorherige Annahme unterstützte. Die Tatsache, dass es sich um einzelne Moleküle handelt, erklärt die große Herausforderung Ku-Foci mittels Immunfluoreszenz nachzuweisen. Ku kommt in großen Mengen in der Zelle vor und war auch nach CSK-Puffer-Behandlung (vgl. Kapitel 2.1.4) immer noch an Chromatin gebunden, was nicht extrahiert werden konnte. Der cytoskeletale Puffer (CSK-Puffer) wird oft verwendet, um gelöste Proteine vor der Immunfluoreszenzfärbung effektiver wegwaschen zu können (Cramer und Mitchison 1995). Da Ku auch spezifisch RNA bindet (Ting, Yu *et al.* 2005), wurde dem CSK-Extraktionspuffer RNase A zugesetzt, um RNA abzubauen, wodurch schlussendlich lediglich DNA-gebundenes Ku sichtbar gemacht werden konnte (Britton, Coates *et al.* 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Protokoll optimiert, indem die Konzentration der RNase A im CSK-Puffer und die Behandlung mit diesem CSK-R-Puffer leicht angepasst wurden (vgl. Kapitel 2.1.4 und 2.2.4.5). Als DSB-Marker wurden die Proben zusätzlich gegen 53BP1 gefärbt. Die Auswertung der Ku-positiven Zellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoff- (UNILAC: Primärenergie: 11,4 MeV/u; LET: 168 keV/μm) und Eisenionen (SIS: Primärenergie 1 GeV/u; LET: 155 keV/μm) 15 min im Vergleich zu 1 h nach Bestrahlung in WT- und RNF138-KO-Zellen demonstrierte das Ablösen Ku80s vom Schaden bis 1 h nach Induktion komplexer Schäden durch Ionenbestrahlung. Da sowohl in WT- als auch RNF138-defizienten Zellen 1 h im Vergleich zu 15 min nach Bestrahlung mit Kohlenstoff als auch Eisenionen signifikant weniger Ku-, 53BP1-positive Zellen ausgemacht werden konnten (vgl. Abbildung 44), schien der Prozess unabhängig der Ubiquitin-Ligase RNF138 zu verlaufen. Mit in allen Fällen über 85% weniger Ku-positiven Zellen war der Effekt sehr eindeutig und signifikant. Daher konnte trotz der Tatsache, dass die Analyse zellzyklusunabhängig erfolgte, aufgrund des nur noch minimalen Anteils an Ku-positiven Zellen 1 h nach Bestrahlung und dessen, dass G1-Phase-Zellen auch 1 h nach Bestrahlung den Hauptteil der Zellen im Zellzyklus darstellen, davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Effekt auch für G1-Phase-Zellen zutrifft.

Zusammenfassend konnte demnach festgehalten werden, dass Ku80 nach Induktion komplexer Schäden durch Ionenbestrahlung 1 h nach Bestrahlung unabhängig der Zellzyklusphase nicht mehr am Schaden nachweisbar ist und RNF138 für Ku80s Ablösen vom Schaden nicht entscheidend ist.

4.4.4. Rolle der Ubiquitinierung von Ku80 durch die Ubiquitin-Ligasen RNF138 und RNF8 nach Bestrahlung mit Eisenionen

Mit Hilfe des zuvor bereits angewendeten Ubiquitin-*Pulldowns* und anschließendem Färben gegen ubiquitinierte Proteine im Westernblot, konnte die strahlungs- und LET-abhängige Zunahme ubiquitinierten Proteine und die Relevanz der beiden Ubiquitin-Ligasen RNF138 und RNF8 für diese Zunahme gezeigt werden (vgl. Abbildung 40). Durch Färbung gegen spezifische Proteine im Westernblot nach erfolgtem Ubiquitin-*Pulldown* bietet dieser Assay zudem die Möglichkeit Veränderungen spezieller Proteinen in ihrer ubiquitinierten Form zu verfolgen. Somit konnte durch Färben gegen Ku80 im Westernblot Veränderungen an ubiquitiniertem Ku80 nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenqualitäten und Herunterregulation unterschiedlicher Faktoren, in diesem Fall der beiden Ubiquitin-Ligasen RNF8 und RNF138 gleichzeitig und alleine, bestimmt werden. Zur besseren Vergleichbarkeit und um quantitative Aussagen treffen zu können, wurde das Level der an die Ubiquitin-*Beads* gebundenen Fraktion (*bound*) zunächst auf das Level des für den *Pulldown* eingesetzten Lysats (*input*) und anschließend auf die jeweilige unbestrahlte Kontrolle normiert (vgl. Abbildung 49B). Im Fall der Ku80-Expression variierte das Proteinexpressionslevel im *input* trotz derselben Anzahl an lysierten Zellen erheblich (vgl. Abbildung 49A), weshalb diese Quantifizierung unbedingt notwendig war. Fluktuationen im Ku80-Expressionslevel an sich könnten im schnellen Umsatz (*turnover*) des Proteins begründet liegen (Feng und Chen 2012) und eine Erklärung für die beobachteten Unterschiede im *input* darstellen. Die quantitative Analyse ließ einerseits die strahlungs- und LET-abhängige Zunahme an ubiquitiniertem Ku80 in G1-Phase WT-Zellen erkennen (blaue Balken), was im Einklang mit der zuvor beobachteten Zunahme an ubiquitinierten Proteinen steht und einen Hinweis auf die Bedeutung der Proteinmodifikation durch Ubiquitinierung des Resektionsantagonisten nach hoch-LET-Bestrahlung lieferte. Nach Ausschaltung der Ubiquitin-Ligase RNF8 alleine (grüne Balken) wie auch nach simultaner Herunterregulation beider Ubiquitin-Ligasen, RNF8 und RNF138 (rote Balken), war nach hoch- sowie niedrig-LET-Bestrahlung keine Zunahme an ubiquitiniertem Ku80 zu erkennen, was dafürspricht, dass RNF8 eventuell doch an der Ubiquitinierung von Ku80 erkennbar mitwirkte. Möglicherweise bedarf es jedoch einer gleichzeitigen Ausschaltung beider Ubiquitin-Ligasen, um auszuschließen, dass die Modifikation durch die noch aktive Ubiquitin-Ligase kompensiert werden kann. Diese Hypothese wurde durch die stärkste Verringerung an ubiquitiniertem Ku80 in RNF138-KO-Zellen mit zusätzlichem RNF8 kd unterstützt (rote Balken). Betrachtet man die Analyse der lediglich RNF138-defizienten Zellen (orangene Balken) ergab sich ein geteiltes Bild. Nach niedrig-LET-Bestrahlung schien der Anteil an ubiquitiniertem Ku80 im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle erhöht, weit höher als in WT-Zellen. Nach hoch-LET-Bestrahlung mit Eisenionen hingegen war der Anteil vergleichbar mit dem der unbestrahlten Kontrolle. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Komplexität der generierten Schäden der entscheidende Faktor für die Beteiligung von RNF138 ist. Erst nach Induktion einer höheren Anzahl komplexer Schäden, wie nach Ionenbestrahlung, und einem erhöhten Anteil resektionsabhängig ablaufender DSB-Reparatur in G1 würde ein Mitwirken von RNF138 in dieser Zellzyklusphase erforderlich. Generell gilt jedoch zu beachten, dass der hier angewendete Ubiquitin-*Pulldown* aus dem Gesamtzelllysat der sortierten G1-Phase-Zellen durchgeführt wurde. Somit werden nicht nur Modifikationen, die im Nukleus im Zusammenhang mit DNA-gebundenem Ku80 stattfinden, betrachtet, sondern auch jene, die möglicherweise cytoplasmatisch oder

an freiem, ungebundenem Ku80 auftreten können. Eine vorherige Fraktionierung der Zellen hätte den *Pulldown* und dessen Aussage diesbezüglich konkretisieren können, doch waren die Möglichkeiten ausreichend mit Eisenionen-bestrahlte G1-Phase-Zellen zu erhalten ohnehin begrenzt, sodass das Experiment nur einmal durchgeführt werden konnte und von einer Fraktionierung abgesehen werden musste. Dieses Experiment muss daher wiederholt werden, um eine gesicherte Aussage treffen zu können.

Dennoch kann festgehalten werden, dass die Ubiquitin-Ligase RNF8 eventuell auch im Zusammenspiel mit RNF138 für die Ubiquitinierung von Ku80 in G1-Phase-Zellen auch nach Ionenbestrahlung wichtig zu sein scheint. Die Notwendigkeit einer Beteiligung von RNF138 hängt mutmaßlich von der Strahlenqualität und folglich der Komplexität der induzierten Schäden ab, jedoch zeigten vorherige Immunfluoreszenzanalysen, dass nach Induktion komplexer Schäden durch Ionenbestrahlung RNF138 alleine nicht für das Ablösen Ku80s vom Schaden entscheidend ist.

Diverse Veröffentlichungen beschrieben das Ablösen Ku80s vom Schaden infolge von DSBs durch dessen Ubiquitinierung (Postow, Ghenoiu *et al.* 2008, Postow 2011), zeigten jedoch beispielsweise auch, dass die Ubiquitinierung Kus neddylierungsabhängig verläuft (Brown, Lukashchuk *et al.* 2015) oder der SCF-Komplex im Zusammenspiel mit Fbx12 die Ubiquitinierung von Ku80 infolge eines DNA-Schadens vermittelt (Postow und Funabiki 2013). Ishida, Nakagawa *et al.* (2017) brachten Ergebnisse hervor, die belegen, dass für die Fertigstellung der DSB-Reparatur über NHEJ Ku80 durch RNF126 ubiquitiniert und somit vom repartierten Bruch entfernt werden kann. Aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Ubiquitin-Analysen zum Zeitpunkt 1 h nach Bestrahlung, sollte die von Ishida, Nakagawa *et al.* (2017) beschriebene RNF126-abhängige Ku-Ubiquitinierung am Ende der DSB-Reparatur über NHEJ nicht angesprochen worden sein. Zuvor konnte jedoch gezeigt werden, dass die RNF138-Defizienz an sich die Resektion in G1 nach Ionenbestrahlung nachweisbar negativ beeinflusst, weshalb im weiteren Verlauf die Regulation der DNA-End-Resektion über andere Zielproteine der Ubiquitin-Ligase RNF138 näher betrachtet wurde.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse darauf schließen lassen, dass der Resektionsantagonist Ku80 nach Induktion komplexer Schäden durch Ionenbestrahlung vom Schaden entfernt wird und sich dieses Ablösen möglicherweise stimulierend auf die Resektion wirkt. Jedoch konnte keine entscheidende Relevanz der Ubiquitin-Ligase RNF138 alleine für das Ablösen Ku80s festgestellt werden, weshalb davon auszugehen war, dass eine RNF138-Defizienz die Resektion nicht über Ku80 als Target der Ubiquitin-Ligase beeinträchtigt.

4.5. Beitrag des RNF138-Target CtIP an der Resektionsregulation in G1 nach Ionenbestrahlung

Frühere Arbeiten in unserer Gruppe von Tatyana Syzonenko suggerierten eine Beteiligung von RIF1 bei der DDR nach Induktion komplexer Schäden, da eine Rekrutierung von RIF1 an ioneninduzierten DSBs in beiden Zellzyklusphasen nachgewiesen werden konnte (Dissertation Tatyana Syzonenko 2017 Abbildung 4.1). Direkte Auswirkungen einer siRNA-basierten Herunterregulation von RIF1 auf die DNA-End-Resektion ließen sich jedoch nicht feststellen. Mehrere Studien zeigten das antagonistische Zusammenspiel des 53BP1/RIF1-Komplexes und des Brustkrebsgen 1 (*BRCA1*) im Zusammenspiel mit dem Resektionsfaktor

CtIP bei der Regulation der DNA-End-Resektion (Bouwman, Aly *et al.* 2010, Bunting, Callen *et al.* 2010, Chapman, Sossick *et al.* 2012, Escibano-Diaz, Orthwein *et al.* 2013, Zimmermann, Lottersberger *et al.* 2013, Bakr, Kocher *et al.* 2016). Während 53BP1 im Komplex mit RIF1 Resektion entgegenwirkt, nimmt BRCA1 zusammen mit CtIP eine Resektionsfördernde Rolle ein (Chapman, Barral *et al.* 2013, Escibano-Diaz, Orthwein *et al.* 2013, Zimmermann, Lottersberger *et al.* 2013). Beim Übergang der Zellen von der G1- in die S-Phase wird der resektionsantagonistische Komplex 53BP1/RIF1 vom Schaden entfernt und durch den resektionsfördernden Komplex aus BRCA1 und CtIP ersetzt (Escibano-Diaz, Orthwein *et al.* 2013). Dieser Vorgang wird durch die zellzyklusabhängige Phosphorylierung von CtIP durch Cdk's unterstützt (Sartori, Lukas *et al.* 2007). Die erwähnten Untersuchungen von Tatyana Syzonenko ließen dennoch erkennen, dass die Depletion von RIF1 die Anzahl an BRCA1-Foci auch in G1 nach Ionenbestrahlung erhöhte, wodurch sich eine Relevanz von BRCA1 für die Resektion in G1 andeutete (Dissertation Tatyana Syzonenko 2017 Abbildung 4.13). Andere Veröffentlichungen beschrieben die Katalysation der Ubiquitinierung von CtIP durch BRCA1 im Verlauf der HR über dessen N-terminale (*really interesting new gene*) RING-Domäne (Yu, Fu *et al.* 2006).

Neben Mre11, einem Faktor des MRN Komplexes, und der Exonuklease Exo1 konnten Auerbeck, Ringel *et al.* (2014) auch die Wichtigkeit des Resektionsfaktors CtIP für die Reparatur komplexer DSBs in G1 darstellen. Die siRNA-basierte Herunterregulation des Resektionsfaktors führte 1 h nach Bestrahlung mit verschiedenen schweren Ionen (Gold, Blei, Zinn, Uran) zu einer Verringerung RPA-positiver Zellen in CENP-F-negativen G1-Phase und CENP-F-positiven S/G2-Phasen Zellen (Auerbeck, Ringel *et al.* 2014). CtIP wird während des Zellzyklusses durch Cdk's reguliert (Yu und Chen 2004, Huertas und Jackson 2009, Peterson, Li *et al.* 2013). Für die Aktivierung der Resektion und Reparatur über HR konnte zudem die Interaktion mit Nbs1 und die Phosphorylierung des Resektionsfaktors CtIP an T847 und S327 durch Cdk1/2 und ATM nachgewiesen werden (Wang, Shi *et al.* 2013). Barton, Naumann *et al.* (2014) beschäftigten sich auch mit CtIP und der Rolle des Resektionsfaktors in G1. Hierbei konnte gezeigt werden, dass CtIP nach Schadensinduktion ebenfalls an T847 und S327 jedoch durch Plk3 (*Polo-like kinase 3*) phosphoryliert wird und beide Faktoren an alternativen NHEJ-Reparaturprozessen in G1 maßgeblich beteiligt sind (Barton, Naumann *et al.* 2014, Wang, Qiu *et al.* 2018). Nach Schmidt, Galanty *et al.* (2015) fördert die posttranslationale Modifikation durch Ubiquitinierung von CtIP in S/G2 die Rekrutierung des Resektionsfaktors an DSBs. Diese Daten lieferten zudem eindeutige Hinweise darauf, dass diese Proteinmodifikation in S/G2 durch die Ubiquitin-Ligase RNF138 erfolgt, weshalb der Möglichkeit, dass RNF138 die Resektion über die Ubiquitinierung von CtIP nach Ionenbestrahlung auch in G1 stimuliert, nachgegangen wurde.

4.5.1. Verminderte Rekrutierung des Resektionsfaktors CtIP an komplexe DSBs in RNF138-depletierten Zellen

In Abbildung 50 dargestellte Ergebnisse lieferten erste Hinweise, dass sich eine RNF138-Defizienz nach Ionenbestrahlung auch in G1 über eine beeinträchtigte CtIP-Rekrutierung negativ auf die Resektion auswirken könnte, da ein *Knockdown* bzw. *Knockout* von RNF138 die relative Anzahl an CtIP-positiven Zellen in beiden Zellzyklusphasen nach Eisen- als auch Kohlenstoffionenbestrahlung signifikant verringerte (vgl. Abbildung 50). Für S/G2 stimmt dieser Effekt mit bereits veröffentlichten Daten von Schmidt, Galanty *et al.* (2015) überein,

die speziell Cyclin A-positive Zellen nach Laserbestrahlung betrachteten. Unterstützend zu den gewonnenen Resultaten nach Ionenbestrahlung konnten diese auch nach Laserbestrahlung (*LMI = laser microirradiation*) verifiziert werden (vgl. Abbildung 51). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Stickstoff UVA-Laser bei einer Wellenlänge von 337 nm verwendet. Infolge von Laserbestrahlung treten verschiedene Formen von DNA-Schäden von oxidativen Basenschäden über Einzelstrangbrüche (SSBs) bis hin zu DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) auf (Lan, Nakajima *et al.* 2004). Studien vermuten, dass die Dichte an DSBs, die durch Zwei-Photonen-Laserbestrahlung oder die in der vorliegenden Arbeit verwendete UVA-Laserbestrahlung höher ist als nach Bestrahlung mit Schwerionen (Williams, Stap *et al.* 2007). Analysen in unserer Arbeitsgruppe von Splinter, Jakob *et al.* (2010) schätzten die äquivalente lokale Laserdosis (*laser dose equivalent = LDE*) nach UVA-LMI unter Berücksichtigung der lokal applizierten Dosis auf einen Bereich von einigen hundert Gray. Demzufolge war nach Laserbestrahlung mit komplexen Schäden zu rechnen und wurde als zusätzliches Verfahren die Rekrutierung von CtIP auch in G1 in Anhängigkeit der Präsenz oder Abwesenheit von RNF138 zu analysieren eingesetzt. Zuvor beobachtete Ergebnisse nach Ionenbestrahlung konnten nach Laserbestrahlung bestätigt werden (vgl. Abbildung 51). Erzielte Resultate belegten zwar einen Einfluss der E3 Ubiquitin-Ligase RNF138 auf die Rekrutierung des Resektionsfaktors CtIP nach Ionenbestrahlung auch in G1, dennoch könnte sich die RNF138-Defizienz indirekt auf CtIP über andere zwischengeschaltete Faktoren auswirken. Um dieser Frage nachzugehen sollte folglich die Interaktion der beiden Proteine in G1-Phase-Zellen genauer betrachtet werden.

4.5.2. Interaktion des Resektionsfaktors CtIP mit der E3 Ubiquitin-Ligase RNF138

Für die Interaktionsanalyse von RNF138 und CtIP wurden Hela.S-Fucci-Zellen mit verschiedenen Strahlenqualitäten, Röntgen sowie Kohlenstoffionen (Primärenergie: 6,5 MeV/u; LET: 325 keV/μm), bestrahlt, anschließend G1-Phase-Zellen herausgefiltert und nun CtIP über eine spezifisch an *Magnetbeads*-gekoppelten Antikörper präzipitiert. Die darauffolgende Westernblotanalyse ließ eine schwache Interaktion von CtIP mit RNF138 in G1-Phase-Zellen erkennen, jedoch war diese Interaktion strahlungsunabhängig. Möglicherweise war der Zeitpunkt der Interaktionsanalyse 1 h nach Bestrahlung etwas spät, sodass der Hauptteil an CtIP nicht mehr RNF138-gebunden vorlag. Zudem wurden diese Lysate zuvor keiner Fraktionierung unterzogen, was bedeutet, dass nicht nur im Nukleus vorkommendes CtIP, das im Zusammenhang mit der Reparatur von DSBs steht, analysiert wurde, sondern jegliches in der Zelle exprimierte CtIP. Dies könnte die nur schwach nachzuweisende Interaktion erklären, da nur ein Teil, nämlich jener, der an DSBs rekrutiert wird, in Verbindung mit RNF138 steht. Aufgrund dessen sollte die Interaktion der beiden Proteine auch in die andere Richtung, durch Präzipitation von RNF138 und Nachweis von CtIP im Westernblot, untersucht werden. Das Binden von ausreichend endogenem RNF138 für eine Interaktionsanalyse in G1 erwies sich als äußerst schwierig, was auf nicht sehr effektiv agierende Antikörper, die RNF138 nur schlecht binden, zurückzuführen sein könnte. In beiden Fällen sollte die Generierung eines Plasmids, indem RNF138 an einen FLAG-Tag gebunden wurde Abhilfe leisten. Ausgehend von einem kommerziell erworbenen Plasmid, das GFP-*getaggt*es RNF138 codiert, wurde ein Plasmid hergestellt, indem der GFP-Tag durch einen FLAG-Tag ersetzt wurde. GFP eignete sich nicht als Tag für die IP, da die Grundvoraussetzung für die Analyse in G1 die Sortierung der Hela.S-Fucci aufgrund derer fluoreszenzmarkierter Zellzyklusproteine war, die durch eine zusätzliche GFP-Expression nicht

mehr möglich gewesen wäre. Die Funktionalität des generierten RNF138-FLAG-Plasmids konnte dennoch über die Rekrutierung von RNF138 an Laser-induzierte Schäden, wie sie zuvor in RNF138-GFP transfizierten Zellen beobachtet werden konnte, verifiziert werden (vgl. Abbildung 53). Die RNF138-Rekrutierung an Laser-induzierte Schäden steht hierbei im Einklang mit bereits veröffentlichten Daten mehrerer Autoren, die RNF138-Rekrutierung ab 1 min bis 25 min nach Induktion des Schadens nachweisen konnten (Ismail, Gagne *et al.* 2015, Schmidt, Galanty *et al.* 2015, Han, Liang *et al.* 2016). Mit nur 24 bp Länge ist der FLAG-Tag im Vergleich zum GFP-Tag mit etwa 30 kDa deutlich kleiner, was ein weiterer Vorteil ist die Funktionalität vergleichbar zum endogenen RNF138 zu gewährleisten. Die transiente Transfektion des hergestellten RNF138-FLAG-Plasmids erwies sich als unproblematisch, doch war die Interaktionsanalyse dennoch nicht möglich, da im Bereich von 35 kDa, dem molekularen Gewicht von RNF138, zu viele unspezifische Banden sowohl in der Kontrolle als auch den Proben auftraten, sodass eine eindeutige Zuordnung nicht möglich war.

Somit konnte schlussendlich lediglich festgehalten werden, dass CtIP strahlungsunabhängig mit RNF138 interagiert. Dies entspricht IP-Experimenten von Schmidt, Galanty *et al.* (2015), die RNF138 nach Präzipitation von CtIP über einen GFP-Tag in unbestrahlten als auch 30 min nach Bestrahlung mit 15 Gy nachweisen konnten, wobei die Interaktion nach Bestrahlung augenscheinlich nicht stärker erschien. Bevor jedoch Interaktionsanalysen in Zukunft möglicherweise weiter vertieft werden, wurde das Augenmerk zunächst auf die posttranslationale Modifikation durch Ubiquitinierung mittels des etablierten Ubiquitin-*Pulldowns* gelegt.

4.5.3. RNF138 ist für die Ubiquitinierung von CtIP in G1-Phase-Zellen essentiell

Um die Ubiquitinierung von CtIP zu studieren, wurden Ubiquitin-*Pulldown*-Experimente in WT- und RNF138-defizienten Zellen durchgeführt. Der Tatsache geschuldet, dass im Zuge der zuvor ermittelten Ku-Ubiquitinierung auch RNF8-depletierte Zellen untersucht wurden und Lysate hierfür vorhanden waren, wurden RNF8 kd als auch G1-Phase-Zellen, in denen sowohl RNF8 als auch RNF138 ausgeschaltet wurden, mit analysiert. Die Quantifizierung an ubiquitiniertem CtIP ließ eine strahlungs- und LET-abhängige Zunahme der an posttranslational modifiziertem CtIP erkennen (vgl. Abbildung 54C). Mit Hilfe von IP-Experimenten konnten Schmidt, Galanty *et al.* (2015), die CtIP zellzyklusunabhängig über einen GFP-Tag präzipitieren, in WT-Zellen ebenfalls eine strahlungsabhängige Zunahme an ubiquitiniertem CtIP zeigen. Nach RNF8 kd war diese Strahlungsabhängigkeit nicht mehr nachzuweisen, in RNF138-KO-Zellen hingegen war quasi kein ubiquitiniertes CtIP mehr zu detektieren (vgl. Abbildung 54A), was die Relevanz der Ubiquitin-Ligase RNF138 für die Ubiquitinierung von CtIP in G1 eindeutig unter Beweis stellte. Möglicherweise ist also sowohl die in dieser Arbeit aufgezeigte Proteinmodifikation durch Ubiquitinierung über RNF138 für die Rekrutierung von CtIP als auch die von Barton, Naumann *et al.* (2014) beschriebene Modifikation durch Phosphorylierung des Resektionsfaktors durch Plk3 für dessen Aktivierung für die Resektion und schlussendlich erfolgreiche Reparatur wichtig.

Mittels Massenspektrometrie identifizierten Schmidt und ihre Kollegen 13 ubiquitinierte Lysine im CtIP-Protein, wovon eine dieser Aminosäuren keine Rolle bei der CtIP-Rekrutierung spielte (Kaidi, Weinert *et al.* 2010). Nach Herstellung verschiedener Mutanten konnte in diesen veröffentlichten Studien mittels IP-Experimenten sowie Laserbestrahlung festgestellt werden, dass höchstwahrscheinlich die Ubiquitinierung von

CtIP am N-Terminus für die DNA-End-Resektion entscheidend ist (Schmidt, Galanty *et al.* 2015). Ob dies auch speziell für G1-Phase-Zellen zutrifft, gilt es allerdings zunächst nach Ionenbestrahlung zu verifizieren. Zusammenfassend kann jedoch festgehalten werden, dass die posttranslationale Modifikation des Resektionsfaktors CtIP durch die Ubiquitin-Ligase RNF138 ein Regulator der DNA-End-Resektion in G1 ist. Abschließend wurden die Auswirkungen der zuvor demonstrierten Einflussnahme von RNF138 über CtIP auf die Resektion in G1 auf die DSB-Reparatur und das Überleben von Zellen erforscht.

4.6. Auswirkungen der Ubiquitinierung durch RNF138 auf die DNA-DSB-Reparatur und das klonogene Zellüberleben

In den vorherigen Kapiteln dargestellte Ergebnisse konnte die Relevanz der E3 Ubiquitin-Ligase RNF138 für die Resektionsregulation in beiden Zellzyklusphasen nachgewiesen werden. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnen Resultate ließen den Schluss zu, dass dieser Effekt auch in G1 auf die RNF138-abhängige Ubiquitinierung des Resektionsfaktor CtIP zurückzuführen ist. Ob sich die beschriebenen Resultate einer RNF138-Defizienz auf die Reparatur von DSBs und das klonogene Zellüberleben nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenqualitäten auswirkt, sollte in diesem letzten Kapitel untersucht werden.

4.6.1. Bedeutung der Ubiquitin-Ligase RNF138 für die DSB-Reparatur nach Induktion von DSBs unterschiedlicher Komplexität

Nach Röntgenbestrahlung war die DSB-Reparatur in RNF138-defizienten Zellen weder in G1 noch G2 signifikant schlechter im Vergleich zu den WT-Zellen (vgl. Abbildung 55 A und Abbildung 55B). In G1-Phase-Zellen war nach Awerbeck, Ringel *et al.* (2014) und Röntgenbestrahlung mit 1,28 Gy quasi keine Resektion in Form von RPA (unter 5% RPA-positive Zellen) erkennbar (SI Abbildung S4). Biehs, Steinlage *et al.* (2017) belegten, dass erst eine Dosis von 20 Gy Röntgen pRPA-Foci in vergleichbarer Anzahl induzieren wie 2 Gy alpha-Teilchen. Da die entstandenen Brüche nach Röntgen nicht so komplex waren, dass sie nicht auch resekionsunabhängig über c-NHEJ repariert werden konnten, war nach Bestrahlung mit 1 Gy niedrig-LET Röntgenstrahlung in G1 auch kein DSB-Reparaturdefekt zu erwarten. γ H2AX-Foci-Analysen in CtIP-depletierten Zellen ließen nach 1,28 Gy bzw. 2,00 Gy Röntgenbestrahlung ebenfalls keinen DSB-Reparaturdefekt erkennen (Awerbeck, Ringel *et al.* 2014, Biehs, Steinlage *et al.* 2017). Geht man davon aus, dass RNF138 über die Ubiquitinierung und folglich der Rekrutierung von CtIP die Resektion beeinflusst, bestätigen die formulierten Erwartungen und veröffentlichten CtIP-Daten die in dieser Arbeit nach Röntgenbestrahlung erzielte Erkenntnisse. Sowohl Schmidt, Galanty *et al.* (2015) als auch Han, Liang *et al.* (2016) wiesen in G2 eine deutlich schlechtere Reparaturreffizienz in siRNF138- und siCtIP-Zellen nach, jedoch wurde hierbei in beiden Fällen mittels des sog. TLR-Assays (*Traffic Light Reporter*) lediglich die Reparatur über HR, sprich resekionsabhängige Reparatur, analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nicht spezifisch DSB-Reparatur über Rekombination betrachtet, sondern alle in G2 ablaufenden Reparaturprozesse. Hierbei offenbarten γ H2AX-Foci-Analysen in G2-Phase RNF138-defizienten Zellen, wenn überhaupt, eine äußerst minimal schlechtere DSB-Reparatur der RNF138-KO-Zellen, in jedem Fall war der Unterschied zu den WT-

Zellen nicht signifikant (vgl. Abbildung 55B). Aufgrund dessen, dass auch in G2-Zellen nach Röntgenbestrahlung der Hauptteil der DSBs resektionsunabhängig über c-NHEJ repariert werden (Shibata, Conrad *et al.* 2011), war der Anteil an DSBs, die in Abhängigkeit von RNF138 resektionsabhängig repariert wurden offensichtlich nicht groß genug, um einen nachweisbareren DSB-Reparaturdefekt in dieser Zellzyklusphase hervorzurufen. Für G2-Phase-Zellen war in den DSB-Reparaturanalysen von Shibata, Conrad *et al.* (2011) eine leicht verbesserte DSB-Reparatur in CtIP-depletierten G2-Phase-Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy Röntgen ersichtlich. Übereinstimmend konnten auch Averbeck, Ringel *et al.* (2014) zum Zeitpunkt 2 h und 4 h nach Bestrahlung mit 1,28 Gy Röntgen ein leicht bessere DSB-Reparatur CtIP-depletierter G2-Zellen feststellen, die sich zum späteren Zeitpunkt 10 h nach Bestrahlung jedoch wieder aufzuheben schien. Für G1-Phase-Zellen waren die veröffentlichten CtIP-Reparaturkinetik nach Röntgen von Shibata, Conrad *et al.* (2011) und Averbeck, Ringel *et al.* (2014) ohne großen Unterschied zu der in dieser Arbeit aufgezeigten RNF138-Röntgen-DSB-Reparaturkinetik (vgl. Abbildung 55A), sodass nach niedrig-LET Röntgenbestrahlung von einer ähnlichen und vergleichbaren DSB-Reparatur in CtIP- und RNF138-defizienten Zellen gesprochen werden konnte.

Wie in Abbildung 59 schematisch dargestellt, verläuft die DSB-Reparatur unabhängig von der Zellzyklusphase in zwei Phasen (Jeggo, Geuting *et al.* 2011). Dies war auch in der zuvor diskutierten DSB-Reparaturkinetik nach Röntgenbestrahlung deutlich erkennbar (vgl. Abbildung 55A und Abbildung 55B). DSB-Reparatur nach hoch-LET-Bestrahlung und vermehrter Induktion komplexer Schäden verläuft im Vergleich zur Reparatur nach niedrig-LET-Bestrahlung wie Röntgen insgesamt langsamer (Shibata, Conrad *et al.* 2011, Tommasino, Friedrich *et al.* 2013), wobei der Haupt-DSB-Reparaturmechanismus immer noch die schnell ablaufende Reparatur über resektionsunabhängiges c-NHEJ darstellt (Gerelchuluun, Manabe *et al.* 2015).

Dies konnte auch nach Bestrahlung mit Eisenionen (SIS18: Primärenergie: 1 GeV/u; LET: 155 keV/μm) gezeigt werden. Der biphasische Verlauf der DSB-Reparatur war deutlich erkennbar, wobei die Reparatur der späten Komponente langsamer verlief als nach Röntgenbestrahlung (vgl. Abbildung 55C und Abbildung 55D). Zwischen WT- und RNF138-KO-Zellen war zu keinem Zeitpunkt weder in G1- noch in G2-Phase-Zellen ein signifikanter Unterschied in der Anzahl an verbleibenden γH2AX-Foci ersichtlich.

γH2AX-Foci-Analysen in WT- und RNF138-defizienten U2OS-Zellen ließen nach hoch-LET-Bestrahlung mit Kohlenstoffionen (Primärenergie: 11,4 MeV/u; LET: 168 keV/μm) sowohl in G1 als auch in G2 eine leicht schlechtere DSB-Reparatur in den RNF138-KO-Zellen erkennen. 10 h nach Bestrahlung war der Unterschied von WT- zu RNF138-KO-Zellen in beiden Zellzyklusphasen signifikant (vgl. Abbildung 55E und Abbildung 55F). Der beobachtete DSB-Reparaturdefekt RNF138-defizienter Zellen nach Kohlenstoffionenbestrahlung war vor allem zu späten Zeiten nach Bestrahlung ausgeprägt, sprich die langsame Reparaturkomponente war beeinträchtigt. Dies spricht dafür, dass lediglich durch Ionenbestrahlung induzierte DSBs aufgrund der erhöhten Schadensdichte und Komplexität der DSBs, sowohl in G1- als auch G2-Phase-Zellen auf resektionsabhängige Reparatur angewiesen sind.

Der LET, sprich die deponierte Energie innerhalb einer bestimmten Distanz, war bei beiden Ionenbestrahlungen mit 155 keV/μm für Eisen und 168 keV/μm für Kohlenstoff ähnlich. Der große Unterschied lag jedoch in der Energie, die bei Eisen mit 1 GeV/u im Vergleich zu Kohlenstoff mit 11,4 MeV/u sehr viel höher

war, was bedeutet, dass die deponierte Energie innerhalb eines speziellen Volumens unterschiedlich war. So wurde im Fall der hoch-energetischen Eisenionenbestrahlung weniger als die Hälfte der Energie in der direkten Ionenspur deponiert und der restliche Anteil hatte Schäden in weiterer Entfernung durch delta-Elektronen zu Folge, die sich ähnlich zu durch Röntgenbestrahlung erzeugten Schäden verhalten und leichter repariert werden können. Niedrig-energetische Bestrahlung mit in diesem Fall Kohlenstoffionen hingegen führte zu einer geringen Geschwindigkeit der Ionen, die Ionisationen in enger räumlicher Nähe und somit komplexere Schäden produzierten. Dies stellt eine Erklärung für die generell schwächeren Auswirkungen der Bestrahlung mit Eisenionen gegenüber der Kohlenstoffionenbestrahlung auf die DSB-Reparatur dar. Auch, dass RNF138-KO-Zellen keinen nachweisbaren DSB-Reparaturdefekt aufwiesen, konnte durch die geringere Komplexität und dem sich an die Röntgenkurve angleichene Kinetik erklärt werden.

Während die langsame Reparaturkomponente in G2 zum Großteil auf resektionsabhängige Reparatur über HR zurückzuführen ist, beschreibt die langsame Komponente in G1 resektionsabhängige, alternative Wege des NHEJ oder die von Biehs, Steinlage *et al.* (2017) beschriebene resektionsabhängige Reparatur über c-NHEJ. Vergleichen mit den Reparaturanalysen von Auerbeck, Ringel *et al.* (2014) in CtIP kd Zellen war der beobachtete Effekt zum Zeitpunkt 10 h nach Kohlenstoffionenbestrahlung mit einer 1,25-fach schlechteren Reparatur in CtIP-depletierten G1-Zellen mit der in dieser Arbeit generierten Reparaturdaten in RNF138-defizienten Zellen, die 10 h später eine 1,45-fach schlechtere DSB-Reparatur aufwiesen, vergleichbar (vgl. Abbildung 55C). In G2-Phase-Zellen war der Reparaturdefekt in RNF138-KO-Zellen und in HR-gehemmten WT-Zellen, durch Zugabe eines Rad51-Inhibitors (B02), ähnlich. Die relative Anzahl an γ H2AX-Foci in Rad51-inhibierten RNF138-KO-Zellen im Vergleich zu lediglich RNF138-defizienten Zellen war noch etwas höher (vgl. Abbildung 56). Möglicherweise war durch den *Knockout* der Ubiquitin-Ligase RNF138 die HR-Maschinerie nicht komplett unterdrückt worden, sodass eine zusätzliche Inhibition der Rekombinase Rad51 zusätzlich negative Auswirkungen auf die DSB-Reparatur hatte. Resektionsanalysen von Auerbeck, Ringel *et al.* (2014) (Figure 2B) bekräftigen diese Theorie, indem sie zeigen konnten, dass der Dreifach-*Knockdown* der Nukleasen CtIP, Mre11 und Exo1 die Resektion deutlich stärker beeinträchtigte als ein CtIP kd alleine, sprich die Herunterregulation des einen Resektionsfaktors hatte die Reparaturmaschinerie nicht komplett gehemmt. Übereinstimmend dazu belegten in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Resektionsanalysen die Wichtigkeit der Ubiquitin-Ligase RNF138 für die Resektion. Dennoch war die Resektion nach Depletion von RNF138 nicht komplett eingedämmt worden, weshalb die gewonnenen Ergebnisse ebenfalls darauf schließen ließen, dass neben RNF138 weitere Faktoren an der Resektionsregulation sowohl in G1 als auch S/G2 beteiligt sind. Dies wiederum bot Raum für den beobachteten, deutlicheren DSB-Reparaturdefekt durch zusätzliche Rad51-Inhibition in RNF138-defizienten Zellen im Vergleich zum alleinigen RNF138-Reparaturdefekt in G2-Phase-Zellen.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die erzielten DSB-Reparaturergebnisse in RNF138-defizienten Zellen unabhängig der analysierten Zellzyklusphase sowohl nach niedrig-LET Röntgenbestrahlung als auch nach hoch-LET Kohlenstoffionenbestrahlung und damit einhergehend verstärkter Induktion komplexer Schäden mit den von Auerbeck, Ringel *et al.* (2014) veröffentlichten Daten in CtIP-depletierten Zellen

vergleichbar waren. Dies unterstützt die anhand vorheriger Resultate getroffene Schlussfolgerung, dass die Ubiquitin-Ligase RNF138 Resektion mutmaßlich über die Modifikation des Resektionsfaktors CtIP beeinflusst. Lediglich komplexe DSBs waren in G1 und G2 auf resektionsabhängige Reparatur angewiesen, weshalb nach Kohlenstoffionenbestrahlung die langsame Reparaturkomponente beeinträchtigt war. Weniger komplexe Schäden wie nach Röntgenbestrahlung werden in G1 hauptsächlich resektionsunabhängig repariert, wohingegen G2-Phase-Zellen nur nach Inhibition der Resektion zu resektionsunabhängigen DSB-Reparaturwegen zu wechseln scheinen.

Wie zuvor bereits erwähnt, ist resektionsabhängige Reparatur in G1 auf alternative EJ-Reparaturwege oder auf den von Biehs, Steinlage *et al.* (2017) beschriebenen c-NHEJ-Weg der DSB-Reparatur zurückzuführen. Nach dem von Löbrich und Jeggo (2017) zusammengefassten Modell der resektionsabhängigen Reparatur über c-NHEJ in G1 bindet Ku an die DNA und wird auch nicht aktiv vom Schaden entfernt, sondern nur weiter nach innen vom Bruch weg verschoben, um Resektion über die Exonukleasen Exo1 und Mre11 zu ermöglichen. Des Weiteren verläuft diese Reparatur DNA-PK-abhängig und benötigt Artemis, um die Reparatur abschließen zu können. Demnach wurde gemutmaßt, dass sich während der Reparatur Intermediate wie Haarnadelstrukturen ausbilden, die über die Nuklease Artemis aufgelöst werden müssen, um im weiteren Verlauf RPA binden und den Prozess beenden zu können (Biehs, Steinlage *et al.* 2017, Löbrich und Jeggo 2017). DSB-Reparaturanalysen nach Röntgen im Vergleich zu Bestrahlung mit Kohlenstoffionen (vgl. Abbildung 55) lieferten bereits erste Hinweise darauf, dass die Komplexität der induzierten Schäden der entscheidende Faktor für die notwendige Beteiligung von RNF138 und CtIP in G1-Phase-Zellen ist. Bei genauerer Betrachtung der Daten von Biehs, Steinlage *et al.* (2017) war augenscheinlich, dass der in diesem Artikel beobachtete Reparaturdefekt in Artemis-defizienten Zellen nach Röntgenbestrahlung durch einen zusätzlichen CtIP kd in diesen Zellen aufgehoben werden konnte, wohingegen dieser Effekt nach Induktion komplexerer Schäden durch alpha-Teilchen nicht mehr nachzuweisen war (Abbildung S3C (Biehs, Steinlage *et al.* 2017)). In dieser Arbeit erzielte Ergebnisse in Artemis-defizienten Zellen mit zusätzlichem RNF138 kd spiegeln die von Biehs, Steinlage *et al.* (2017) veröffentlichten Daten in Artemis-defizienten Zellen mit CtIP kd wieder (vgl. Abbildung 57). Während nach Induktion weniger komplexer Schäden durch Röntgenbestrahlung der Artemis-DSB-Reparaturdefekt zu späten Zeitpunkten nach Bestrahlung durch Herunterregulation des zuvor agierenden (*upstream*) Faktors RNF138 kompensiert werden konnte, war dies nach Induktion komplexerer Schäden durch alpha-Teilchen-Bestrahlung nicht zu beobachten (vgl. Abbildung 57). Der Theorie nach sind die Zellen nach niedrig-LET-Bestrahlung und CtIP-Depletion in der Lage, von dem von Biehs, Steinlage *et al.* (2017) beschriebenen CtIP-/resektionsabhängigen klassischen Weg der nicht-homologen Endverknüpfung (*resection-dependent c-NHEJ = canonical non-homologous end joining*) zu einem anderen DSB-Reparaturmechanismus, möglicherweise dem klassischen Weg der nicht-homologen Endverknüpfung ohne CtIP-Beteiligung (c-NHEJ), zu wechseln und so alle DSBs zu reparieren. Da Artemis in diesem soeben erwähnten DSB-Reparaturmechanismus nach CtIP (*downstream*) agiert, wird davon ausgegangen, dass bei einer Artemis-Defizienz alleine die Reparaturmaschinerie so weit vorangeschritten ist, dass ein Wechsel hin zu einem anderen Reparaturweg unmöglich ist und die Zellen die DSBs nicht mehr reparieren können (Biehs, Steinlage *et al.* 2017). Sind die induzierten Schäden komplexer, wie nach alpha-Teilchen-Bestrahlung, kann ein CtIP kd in bereits Artemis-defizienten Zellen den DSB-Reparaturdefekt nicht

kompensieren (vgl. Abbildung S3C (Biehs, Steinlage *et al.* 2017)). Dies verdeutlichte, dass nicht alleine die Tatsache wie weit der DSB-Reparaturmechanismus bereits vorangeschritten ist, ausschlaggebend ist, ob die Depletion eines für die Resektion essentiellen Faktors einen DSB-Reparaturdefekt zur Folge hat, sondern auch die Komplexität der induzierten Schäden.

Zusammenfassend konnte demnach gesagt werden, dass die Komplexität der induzierten Schäden die wesentliche Komponente darstellt, ob die DSB-Reparatur in G1 resektionsabhängig über RNF138 und CtIP verlaufen muss oder im Zweifel die Möglichkeit besteht die Schäden resektionsunabhängig über c-NHEJ zu reparieren.

4.6.2. RNF138-defiziente Zellen reagieren im Vergleich zu WT-Zellen leicht sensitiver auf die Induktion komplexer Schäden durch Bestrahlung mit Kohlenstoffionen

Nachdem zuvor die Bedeutung der Ubiquitin-Ligase RNF138 für die DSB-Reparatur nach Induktion komplexerer Schäden durch Bestrahlung mit alpha-Teilchen oder Kohlenstoffionen gezeigt werden konnte, sollte abschließend die Genauigkeit der Reparatur nach niedrig-LET Röntgen und hoch-LET Eisen- sowie Kohlenstoffionenbestrahlung über die Analyse des klonogenen Zellüberlebens evaluiert werden (Franken, Rodermond *et al.* 2006). Während mittels DSB-Reparaturkinetiken über den etablierten γ H2AX-Foci-Assay (Löbrich, Shibata *et al.* 2010) lediglich DSBs in einem Zeitraum bis 10 h nach Bestrahlung untersucht wurden, umfassen Überlebensstudien sämtliche DNA-Schäden und deren Reparatur. Bereits im Jahre 1956 wurde diese Technik zur Beurteilung der Koloniebildungsfähigkeit nach Aussaat einzelner humaner Zellen in Zellkulturplatten beschrieben (Puck und Marcus 1956). Die Exaktheit der Reparatur wirkt sich dabei auf das Überleben bzw. die Teilungsfähigkeit der Zellen bis zwölf Tage nach Induktion der Schäden aus und kann somit beurteilt werden (Newshean und Yang 2012). DSBs als schwerwiegendste DNA-Schäden (Rassool 2003) beeinflussen auch maßgeblich das Überleben bzw. die Fähigkeit von Zellen Kolonien, bestehend aus mehr als 50 Zellen, auszubilden. Da der Ubiquitin-Ligase RNF138 eine Funktion bei resektionsabhängig ablaufender Reparatur zugeschrieben wurde, war es nicht verwunderlich, dass RNF138-KO- im Vergleich zu WT-Zellen auf die Röntgenbestrahlung, die nur wenig komplexe Schäden verursacht, in G1 nicht sensitiver reagierten (vgl. Abb. 43A blaue Linien). In S/G2-Phase-Zellen konnte nach Röntgenbestrahlung lediglich eine extrem minimale Sensitivierung ausgemacht werden (vgl. Abbildung 58B blaue Linien), was etwas von bereits veröffentlichten Daten abweicht, die nach Bestrahlung ähnlicher Röntgendosen ein schlechteres Überleben von RNF138-depletierten Zellen nachweisen konnte (Ismail, Gagne *et al.* 2015, Schmidt, Galanty *et al.* 2015, Han, Liang *et al.* 2016), und somit etwas im Kontrast zu diesen Resultaten steht. In all den erwähnten Artikeln wurde mit U2OS-Zellen gearbeitet, wohingegen in der vorliegenden Arbeit für die zellzyklusabhängige Untersuchung des klonogenen Zellüberlebens sortierbare HeLa-S-Fucci-Zellen eingesetzt wurden. Möglicherweise ist der Unterschied auf die verschiedenen Zelllinien zurückzuführen. HeLa-Zellen wurden beschrieben p53 negativ zu sein, obwohl p53 mRNA gebildet wird (Matlashewski, Banks *et al.* 1986). Untersuchungen von May, Jenkins *et al.* (1991) suggerierten, dass p53-mRNA in HeLa-Zellen zwar translatiert wird, das entstandene p53-Protein aber extrem instabil ist. P53 besitzt die Fähigkeit in den Zellzyklus einzugreifen (el-Deiry, Tokino *et al.* 1993, Harper, Adami *et al.* 1993, Gartel 2009) und somit beispielsweise der unkontrollierten Proliferation entarteter

Zellen entgegenzuwirken. Tsuchida, Kaida *et al.* (2015) zeigten, dass sich die Dauer der S/G2-Phase von Hela.S-Fucci-Zellen trotz des instabilen p53 Protein nach Bestrahlung mit steigender Dosis verlängert, was einen Übergang in einen vorübergehenden G2-Arrest vermuten lässt, um die entstandenen Schäden reparieren zu können. Nach deren Untersuchungen veränderte sich die Dauer der G1-Phase bis zu einer Bestrahlung mit 10 Gy Röntgen hingegen nicht und blieb bei etwa 7 h konstant (Tsuchida, Kaida *et al.* 2015), was darauf schließen lässt, dass die Zellen während der G1-Phase in keinen Arrest übergehen. Gemäß in der Literatur beschriebenen Studien, die das Zellüberleben in den verschiedenen Zellzyklusphasen analysierten, wurde das Überleben in S-Phase-Zellen aufgrund fehlerfreier Reparatur über HR am besten, in der späten G2/M-Phase am schlechtesten und in G1 dazwischen liegend eingeschätzt (Sinclair 1968, Bloomer und Adelstein 1982, Pawlik und Keyomarsi 2004). Da in der vorliegenden Arbeit das Überleben von S- und G2-Phase-Zellen zusammen untersucht wurde, könnte sich der in der S-Phase positiv auf das Überleben auswirkende und der sensitivierende Effekt der G2/M-Phase Zellen in WT-Zellen aufgehoben haben. Dadurch könnte sich das schlussendliche Überleben an das der G1-Zellen angleichen haben, weshalb sich das klonogene Zellüberleben zwischen G1- und S/G2-Phase-WT-Zellen nicht sehr stark unterschied (vgl. Abbildung 58A und Abbildung 58B durchgezogene Linien). Aufgrund der beeinträchtigten Resektion in RNF138-defizienten Zellen und der Relevanz der Reparatur über resektionsabhängige HR in S-Phase Zellen war jedoch zu erwarten, dass die gemeinsame Analyse von S- und G2-Phase-Zellen in RNF138-defizienten Zellen eine Strahlensensitivierung weiter verstärken würde. Möglicherweise war dennoch auch in RNF138-KO-Zellen kein Unterschied im klonogenen Zellüberleben zwischen G1- und S/G2-Phase nachzuweisen, da bestrahlte G1-Phase Hela.S-Fucci-Zellen nach Tsuchida, Kaida *et al.* (2015) bis 10 Gy Röntgenbestrahlung keinen G1-Phase Arrest aufweisen. Dies würde bedeuten, dass G1-Phase-Zellen mit zu vielen verbleibenden Schäden in die S-Phase weiterlaufen und folglich vermutlich in die Apoptose übergehen, was sich negativ auf das Zellüberleben in der G1-Phase bestrahlter Zellen auswirken würde.

Bei genauerer Betrachtung der Überlebekurven in G1 fiel zudem auf, dass die Zellen nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen wie 0,2 Gy und 0,5 Gy sensitiver zu reagieren schienen als nach Dosen über 0,5 Gy. Diese Hypersensitivierung wurde auch bei anderen Zelllinien bereits beobachtet, hängt vermutlich aber auch stark von der verwendeten Zelllinie ab und ist in mehreren Veröffentlichungen beschrieben (Lambin, Marples *et al.* 1993, Joiner, Marples *et al.* 2001, Short, Kelly *et al.* 2001). Joiner, Marples *et al.* (2001) stellen zwei Hypothesen auf, warum Zellen gegenüber Bestrahlungen mit niedrigen Dosen sensitiver sein könnten. Zum einen wird vermutet, dass es eine Schwelle (*threshold*) geben könnte, ab dem effektivere Reparatur einsetzt und zum anderen könnten Bestrahlungen mit höheren Dosen zu einer strukturellen Veränderung der DNA führen, die wesentliche Reparaturbedingungen fördert (Joiner, Marples *et al.* 2001).

Nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen war in beiden Zellzyklusphasen ein leicht schlechteres Überleben der RNF138-defizienten im Vergleich zu WT-Zellen nachweisbar (vgl. Abbildung 58 grüne Linien), was den Trend des zuvor beobachteten minimalen DSB-Reparaturdefekt nach derselben Bestrahlung widerspiegelte. Im Fall der Bestrahlung mit Eisenionen lag das Überleben zwischen dem nach Kohlenstoffionen- und Röntgenbestrahlung (vgl. Abbildung 58 orangene Linien). Generell war das Überleben der Zellen nach hoch-LET-Bestrahlung im Vergleich zur niedrig-LET Röntgenbestrahlung stärker beeinträchtigt. Dies kann durch

die unterschiedliche relative biologische Wirksamkeit (*relative biological effectiveness* = *RBE*) der verschiedenen Bestrahlungen und Strahlenqualitäten erklärt werden. Der RBE ist definiert als das Verhältnis der Energiedosis einer Referenzstrahlung, hier Röntgenstrahlung, zur Dosis einer anderen Strahlung, hier Ionenstrahlung, die denselben Effekt, dasselbe Überleben hervorruft. Veröffentlichungen beschrieben den höchsten RBE bei einer Bestrahlung mit einem LET zwischen 100 und 200 keV/μm (Weyrather, Ritter *et al.* 1999), weshalb der RBE der hier angewendeten Eisen- und Kohlenstoffionenbestrahlung hoch einzuschätzen war und die Voraussetzung lieferte Unterschiede im Zellüberleben auszumachen. Der RBE wurde in der vorliegenden Arbeit bei der jeweiligen Dosis berechnet, bei der noch 10% der bestrahlten Zellen überlebten (D_{10}). Mit einem RBE von 1,80 in WT- und 1,74 in RNF138-KO-Zellen in G1 nach Eisenionenbestrahlung war der RBE nahezu identisch, wohingegen der RBE in G1 nach Kohlenstoffionenbestrahlung mit 2,03 in WT- und 3,19 in RNF138-KOs die beobachtete Differenz widerspiegelte (vgl. Abbildung 58). Für S/G2-Phase-Zellen lag der RBE nach Kohlenstoffionenbestrahlung bei 3,38 in WT- und 3,91 in RNF138-KO-Zellen, das auch hier im Gegensatz zur Bestrahlung mit Eisenionen mit einem RBE von 2,30 in WT- und 2,09 in RNF138-defizienten Zellen den Unterschied deutlich erkennen ließ (vgl. Tabelle 4). Vergleicht man den RBE der beiden Ionenbestrahlungen fällt auf, dass der RBE sowohl in G1 als auch S/G2 unabhängig der Präsenz von RNF138 nach Kohlenstoffionenbestrahlung deutlich höher war als nach Bestrahlung mit Eisenionen (vgl. Tabelle 4).

Der Grund, weshalb die RNF138-KO-Zellen im Vergleich zu den WT-Zellen nach Kohlenstoffionenbestrahlung sensibler auf die Bestrahlung reagierten als nach Bestrahlung mit Eisenionen und der RBE wie zuvor erwähnt für Kohlenstoff in beiden Zellzyklusphasen höher war als für Eisen, lag in der unterschiedlichen Energie der Ionen (Kramer, Weyrather *et al.* 2003). Mit 1 GeV/u war die Energie der Eisenionen im Vergleich zur Energie der Kohlenstoffionen mit 11,4 MeV/u sehr viel höher, was bedeutet, dass die Komplexität der generierten Schäden durch Eisenionenbestrahlung aufgrund im vorherigen Kapitel aufgeführter Gründe deutlich geringer im Vergleich zur hoch-energetischen Bestrahlung mit Kohlenstoffionen war. Aufgrund der geringeren Komplexität der induzierten Schäden durch Eisenionenbestrahlung waren die Auswirkungen auf das klonogene Zellüberleben im Vergleich zur Kohlenstoffionenbestrahlung generell schwächer. Auch die geringere Sensitivität der RNF138-KO-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen gegenüber der Bestrahlung mit Eisenionen, konnte durch die Komplexität der induzierten Schäden erklärt werden, die nach Eisenionenbestrahlung geringer war als nach Kohlenstoffbestrahlung.

Neben dem RBE werden Überlebenskurven klassischer Weise auch durch die α - und β -Werte charakterisiert. Höhere α -Werte deuten dabei generell auf eine größere Sensitivität der bestrahlten Zellen hin, was die α -Werte der hier verwendeten Strahlenarten, welche in Tabelle 5 zusammengefasst wurden, bestätigten. Unabhängig der Präsenz von RNF138 und der untersuchten Zellzyklusphase wurde der α -Wert von Röntgen- über Eisen- bis hin zu Kohlenstoffionenbestrahlung immer größer. Der β -Wert bzw. das Verhältnis des α -Werts zum β -Wert hingegen lässt Rückschlüsse auf die Reparaturfähigkeit der Zellen zu (Iliakis 1980, Ando und Goodhead 2016). Je größer der β -Wert bzw. je kleiner das Verhältnis von α zu β , desto besser die Reparatur. Diese ebenfalls in Tabelle 5 aufgelisteten Werte ließen eine schlechterere Reparatur nach Bestrahlung mit Eisenionen im Vergleich zu Röntgen erkennen. Im Fall der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen war ein linearer Verlauf zu

verzeichnen, sodass die quadratische Komponente, der β -Term, Null war und die Reparatur noch schlechter als nach Röntgen- und Eisenionenbestrahlung einzuschätzen war.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Sensitivierung der RNF138-defizienten Zellen gegenüber ionisierender Strahlung in Abhängigkeit der Komplexität der induzierten Schäden steht. Zum einen tritt auch in G1 nach höherer Schadensdichte, sprich Induktion komplexerer Schäden, vermehrt Resektion auf, zum anderen konnte gezeigt werden, dass posttranslationale Modifikationen durch Ubiquitinierung nach hoch-LET Eisenionenbestrahlung verstärkt Anwendung finden. Nicht zuletzt zeigten DSB-Reparatur- sowie Zellüberlebensstudien, dass die Relevanz von RNF138 in seiner Funktion den Resektionsfaktor CtIP zu ubiquitinieren und somit Resektion zu fördern mit der Komplexität der induzierten Schäden zunimmt und für die Reparatur von komplexen Schäden wichtig ist. In Hinblick auf die Schwerionentherapie von Tumoren könnte eine zusätzliche Inhibition der E3 Ubiquitin-Ligase daher eine Möglichkeit darstellen, Tumorzellen mittels der Schwerionentherapie gezielt anzugreifen und die Zellen für die Bestrahlung durch RNF138-Inhibition für die Therapie zu sensibilisieren.

Abschließend ist in Abbildung 60 ein Modell dargestellt, das die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit zusammenfasst. Dieses Modell wurde in Anlehnung an das von Bekker-Jensen und Mailand (2015) erstellte

Schema für S/G2 und der in dieser Arbeit erzielten Resultate erstellt und zeigt eine schematische Wirkungsweise der resektionsfördernden Funktion der Ubiquitin-Ligase RNF138 in G1-Phase-Zellen nach Induktion komplexer Schäden.

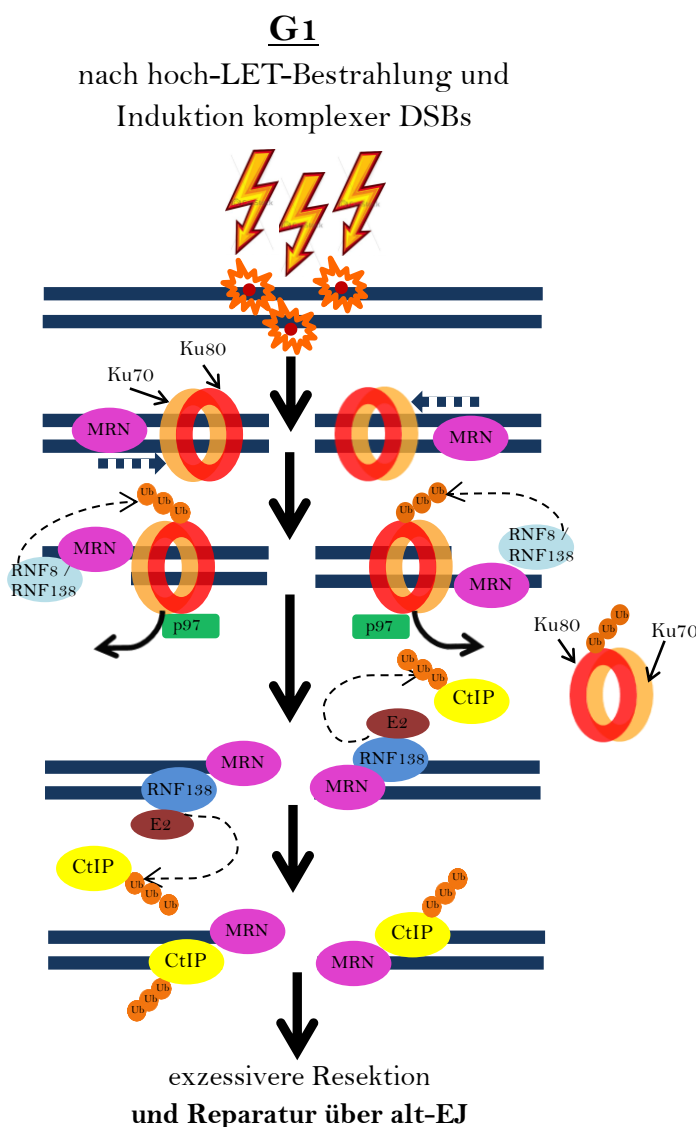


Abbildung 60: Modell der resektionsfördernden Wirkung von RNF138 und Reparatur über alt-EJ nach Induktion komplexer Schäden in G1. Nach DSB-Initiation binden das Ku-Heterodimer sowie der MRN-Komplex an die Bruchenden. Daraufhin erfolgt limitierte Resektion durch den MRN-Komplex, woraufhin Ubiquitin-Ligasen wie RNF8 und RNF138 an den Schaden binden können. Mutmaßlich ein Zusammenspiel der beiden Ubiquitin-Ligase RNF8 und RNF138 ist für die Ubiquitinierung Ku80s verantwortlich, die zur Ablösung des Resektionsantagonisten vom Schaden über p97/VCP führt. Über ein unbekanntes konjugierendes E2-Enzym vermittelt RNF138 die Ubiquitinierung des Resektionsfaktors CtIP und dessen Rekrutierung an die Bruchenden. Folglich kommt es zu einer exzessiveren Resektion und Reparatur des DSB über alternative Wege der Endverknüpfung.

5. Literaturverzeichnis

- Abraham, R. T. (2001). "Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases." Genes Dev **15**(17): 2177-2196.
- Acs, K., M. S. Luijsterburg, L. Ackermann, F. A. Salomons, T. Hoppe und N. P. Dantuma (2011). "The AAA-ATPase VCP/p97 promotes 53BP1 recruitment by removing L3MBTL1 from DNA double-strand breaks." Nat Struct Mol Biol **18**(12): 1345-1350.
- Al-Hakim, A., C. Escibano-Diaz, M. C. Landry, L. O'Donnell, S. Panier, R. K. Szilard und D. Durocher (2010). "The ubiquitous role of ubiquitin in the DNA damage response." DNA Repair (Amst) **9**(12): 1229-1240.
- Alagpulinsa, D. A., S. Ayyadevara und R. J. Shmookler Reis (2014). "A Small-Molecule Inhibitor of RAD51 Reduces Homologous Recombination and Sensitizes Multiple Myeloma Cells to Doxorubicin." Front Oncol **4**: 289.
- Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts und Walter (2005). "Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie." **3. Auflage**.
- Alegria-Schaffer, A., A. Lodge und K. Vattam (2009). "Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection." Methods Enzymol **463**: 573-599.
- Ali, M. A. M., H. Strickfaden, B. L. Lee, L. Spyropoulos und M. J. Hendzel (2018). "RYBP Is a K63-Ubiquitin-Chain-Binding Protein that Inhibits Homologous Recombination Repair." Cell Rep **22**(2): 383-395.
- Ando, K. und D. T. Goodhead (2016). "Dependence and independence of survival parameters on linear energy transfer in cells and tissues." J Radiat Res **57**(6): 596-606.
- Asaithamby, A. und D. J. Chen (2011). "Mechanism of cluster DNA damage repair in response to high-atomic number and energy particles radiation." Mutat Res **711**(1-2): 87-99.
- Averbeck, N. B., O. Ringel, M. Herrlitz, B. Jakob, M. Durante und G. Taucher-Scholz (2014). "DNA end resection is needed for the repair of complex lesions in G1-phase human cells." Cell Cycle **13**(16): 2509-2516.
- Averbeck, N. B., J. Topsch, M. Scholz, W. Kraft-Weyrather, M. Durante und G. Taucher-Scholz (2016). "Efficient Rejoining of DNA Double-Strand Breaks despite Increased Cell-Killing Effectiveness following Spread-Out Bragg Peak Carbon-Ion Irradiation." Front Oncol **6**: 28.
- Aylon, Y., B. Liefshitz und M. Kupiec (2004). "The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle." EMBO J **23**(24): 4868-4875.
- Aymard, F., B. Bugler, C. K. Schmidt, E. Guillou, P. Caron, S. Briois, J. S. Iacovoni, V. Daburon, K. M. Miller, S. P. Jackson und G. Legube (2014). "Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks." Nat Struct Mol Biol **21**(4): 366-374.
- Bakkenist, C. J. und M. B. Kastan (2003). "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation." Nature **421**(6922): 499-506.
- Bakr, A., S. Kocher, J. Volquardsen, C. Petersen, K. Borgmann, E. Dikomey, K. Rothkamm und W. Y. Mansour (2016). "Impaired 53BP1/RIF1 DSB mediated end-protection stimulates CtIP-dependent end resection and switches the repair to PARP1-dependent end joining in G1." Oncotarget **7**(36): 57679-57693.
- Barlow, J. H., M. Lisby und R. Rothstein (2008). "Differential regulation of the cellular response to DNA double-strand breaks in G1." Mol Cell **30**(1): 73-85.

Barton, O., S. C. Naumann, R. Diemer-Biehs, J. Kunzel, M. Steinlage, S. Conrad, N. Makharashvili, J. Wang, L. Feng, B. S. Lopez, T. T. Paull, J. Chen, P. A. Jeggo und M. Löbrich (2014). "Polo-like kinase 3 regulates CtIP during DNA double-strand break repair in G1." J Cell Biol **206**(7): 877-894.

Bekker-Jensen, S. und N. Mailand (2015). "RNF138 joins the HR team." Nat Cell Biol **17**(11): 1375-1377.

Bethe, H. (1930). "Zur Theorie des Durchgangs schneller Korpuskularstrahlen durch Materie." Annalen der Physik **397**: 325-400.

Bianconi, E., A. Piovesan, F. Facchin, A. Beraudi, R. Casadei, F. Frabetti, L. Vitale, M. C. Pelleri, S. Tassani, F. Piva, S. Perez-Amodio, P. Strippoli und S. Canaider (2013). "An estimation of the number of cells in the human body." Ann Hum Biol **40**(6): 463-471.

Biehs, R., M. Steinlage, O. Barton, S. Juhasz, J. Kunzel, J. Spies, A. Shibata, P. A. Jeggo und M. Löbrich (2017). "DNA Double-Strand Break Resection Occurs during Non-homologous End Joining in G1 but Is Distinct from Resection during Homologous Recombination." Mol Cell **65**(4).

Blaisdell, J. O., L. Harrison und S. S. Wallace (2001). "Base excision repair processing of radiation-induced clustered DNA lesions." Radiat Prot Dosimetry **97**(1): 25-31.

Bloch, F. (1933). "Zur Bremsung rasch bewegter Teilchen beim Durchgang durch Materie." Annalen der Physik **408**.

Bloomer, W. D. und S. J. Adelstein (1982). "The mammalian radiation survival curve." J Nucl Med **23**(3): 259-265.

Bodnar, A. G., M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner und W. E. Wright (1998). "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells." Science **279**(5349): 349-352.

Bohgaki, M., T. Bohgaki, S. El Ghamrasni, T. Srikumar, G. Maire, S. Panier, A. Fradet-Turcotte, G. S. Stewart, B. Raught, A. Hakem und R. Hakem (2013). "RNF168 ubiquitylates 53BP1 and controls its response to DNA double-strand breaks." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(52): 20982-20987.

Bothmer, A., D. F. Robbiani, N. Feldhahn, A. Gazumyan, A. Nussenzweig und M. C. Nussenzweig (2010). "53BP1 regulates DNA resection and the choice between classical and alternative end joining during class switch recombination." J Exp Med **207**(4): 855-865.

Bouwman, P., A. Aly, J. M. Escandell, M. Pieterse, J. Bartkova, H. van der Gulden, S. Hiddingh, M. Thanasoula, A. Kulkarni, Q. Yang, B. G. Haffty, J. Tommiska, C. Blomqvist, R. Drapkin, D. J. Adams, H. Nevanlinna, J. Bartek, M. Tarsounas, S. Ganesan und J. Jonkers (2010). "53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers." Nat Struct Mol Biol **17**(6): 688-695.

Branzei, D., M. Seki und T. Enomoto (2004). "Rad18/Rad5/Mms2-mediated polyubiquitination of PCNA is implicated in replication completion during replication stress." Genes Cells **9**(11): 1031-1042.

Brenner, D. J. und J. F. Ward (1992). "Constraints on energy deposition and target size of multiply damaged sites associated with DNA double-strand breaks." Int J Radiat Biol **61**(6): 737-748.

Brinkmann, K., M. Schell, T. Hoppe und H. Kashkar (2015). "Regulation of the DNA damage response by ubiquitin conjugation." Front Genet **6**: 98.

Britton, S., J. Coates und S. P. Jackson (2013). "A new method for high-resolution imaging of Ku foci to decipher mechanisms of DNA double-strand break repair." J Cell Biol **202**(3): 579-595.

- Brown, E. J. und D. Baltimore (2000). "ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality." Genes Dev **14**(4): 397-402.
- Brown, J. S., N. Lukashchuk, M. Sczaniecka-Clift, S. Britton, C. le Sage, P. Calsou, P. Beli, Y. Galanty und S. P. Jackson (2015). "Neddylation promotes ubiquitylation and release of Ku from DNA-damage sites." Cell Rep **11**(5): 704-714.
- Buisson, R., A. M. Dion-Cote, Y. Coulombe, H. Launay, H. Cai, A. Z. Stasiak, A. Stasiak, B. Xia und J. Y. Masson (2010). "Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination." Nat Struct Mol Biol **17**(10): 1247-1254.
- Bunting, S. F., E. Callen, N. Wong, H. T. Chen, F. Polato, A. Gunn, A. Bothmer, N. Feldhahn, O. Fernandez-Capetillo, L. Cao, X. Xu, C. X. Deng, T. Finkel, M. Nussenzweig, J. M. Stark und A. Nussenzweig (2010). "53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks." Cell **141**(2): 243-254.
- Celeste, A., O. Fernandez-Capetillo, M. J. Kruhlak, D. R. Pilch, D. W. Staudt, A. Lee, R. F. Bonner, W. M. Bonner und A. Nussenzweig (2003). "Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks." Nat Cell Biol **5**(7): 675-679.
- Chan, D. W., B. P. Chen, S. Prithivirajasingh, A. Kurimasa, M. D. Story, J. Qin und D. J. Chen (2002). "Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks." Genes Dev **16**(18): 2333-2338.
- Chan, S. H., A. M. Yu und M. McVey (2010). "Dual roles for DNA polymerase theta in alternative end-joining repair of double-strand breaks in *Drosophila*." PLoS Genet **6**(7): e1001005.
- Chang, H. H. Y., N. R. Pannunzio, N. Adachi und M. R. Lieber (2017). "Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair." Nat Rev Mol Cell Biol **18**(8): 495-506.
- Chanut, P., S. Britton, J. Coates, S. P. Jackson und P. Calsou (2016). "Coordinated nuclease activities counteract Ku at single-ended DNA double-strand breaks." Nat Commun **7**: 12889.
- Chapman, J. R., P. Barral, J. B. Vannier, V. Borel, M. Steger, A. Tomas-Loba, A. A. Sartori, I. R. Adams, F. D. Batista und S. J. Boulton (2013). "RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection." Mol Cell **49**(5): 858-871.
- Chapman, J. R., A. J. Sossick, S. J. Boulton und S. P. Jackson (2012). "BRCA1-associated exclusion of 53BP1 from DNA damage sites underlies temporal control of DNA repair." J Cell Sci **125**(Pt 15): 3529-3534.
- Chapman, J. R., M. R. Taylor und S. J. Boulton (2012). "Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice." Mol Cell **47**(4): 497-510.
- Chen, R. und M. S. Wold (2014). "Replication protein A: single-stranded DNA's first responder: dynamic DNA-interactions allow replication protein A to direct single-strand DNA intermediates into different pathways for synthesis or repair." Bioessays **36**(12): 1156-1161.
- Chen, X., R. Zhao, G. G. Glick und D. Cortez (2007). "Function of the ATR N-terminal domain revealed by an ATM/ATR chimera." Exp Cell Res **313**(8): 1667-1674.
- Chernikova, S. B., J. C. Game und J. M. Brown (2012). "Inhibiting homologous recombination for cancer therapy." Cancer Biol Ther **13**(2): 61-68.
- Chiruvella, K. K., Z. Liang und T. E. Wilson (2013). "Repair of double-strand breaks by end joining." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(5): a012757.

- Ciechanover, A., D. Finley und A. Varshavsky (1984). "The ubiquitin-mediated proteolytic pathway and mechanisms of energy-dependent intracellular protein degradation." J Cell Biochem **24**(1): 27-53.
- Ciechanover, A., D. Finley und A. Varshavsky (1984). "Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85." Cell **37**(1): 57-66.
- Clerici, M., D. Mantiero, I. Guerini, G. Lucchini und M. P. Longhese (2008). "The Yku70-Yku80 complex contributes to regulate double-strand break processing and checkpoint activation during the cell cycle." EMBO Rep **9**(8): 810-818.
- Cramer, L. P. und T. J. Mitchison (1995). "Myosin is involved in postmitotic cell spreading." J Cell Biol **131**(1): 179-189.
- D'Amours, D. und S. P. Jackson (2002). "The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(5): 317-327.
- Daley, J. M. und P. Sung (2013). "RIF1 in DNA break repair pathway choice." Mol Cell **49**(5): 840-841.
- Dantuma, N. P., K. Acs und M. S. Luijsterburg (2014). "Should I stay or should I go: VCP/p97-mediated chromatin extraction in the DNA damage response." Exp Cell Res **329**(1): 9-17.
- Deckbar, D., P. A. Jeggo und M. Löbrich (2011). "Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints." Crit Rev Biochem Mol Biol **46**(4): 271-283.
- DiBiase, S. J., Z. C. Zeng, R. Chen, T. Hyslop, W. J. Curran, Jr. und G. Iliakis (2000). "DNA-dependent protein kinase stimulates an independently active, nonhomologous, end-joining apparatus." Cancer Res **60**(5): 1245-1253.
- Dinant, C., M. de Jager, J. Essers, W. A. van Cappellen, R. Kanaar, A. B. Houtsmuller und W. Vermeulen (2007). "Activation of multiple DNA repair pathways by sub-nuclear damage induction methods." J Cell Sci **120**(Pt 15): 2731-2740.
- DiTullio, R. A., Jr., T. A. Mochan, M. Venere, J. Bartkova, M. Sehested, J. Bartek und T. D. Halazonetis (2002). "53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer." Nat Cell Biol **4**(12): 998-1002.
- Doil, C., N. Mailand, S. Bekker-Jensen, P. Menard, D. H. Larsen, R. Pepperkok, J. Ellenberg, S. Panier, D. Durocher, J. Bartek, J. Lukas und C. Lukas (2009). "RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins." Cell **136**(3): 435-446.
- Dorai, R. und M. J. Kushner (2003). "A model for plasma modification of polypropylene using atmospheric pressure discharges." J Phys D Appl Phys **36**: 666.
- Eccles, L. J., M. E. Lomax und P. O'Neill (2010). "Hierarchy of lesion processing governs the repair, double-strand break formation and mutability of three-lesion clustered DNA damage." Nucleic Acids Res **38**(4): 1123-1134.
- El-Aouar Filho, R. A., A. Nicolas, T. L. De Paula Castro, M. Deplanche, V. A. De Carvalho Azevedo, P. L. Goossens, F. Taieb, G. Lina, Y. Le Loir und N. Berkova (2017). "Heterogeneous Family of Cyclomodulins: Smart Weapons That Allow Bacteria to Hijack the Eukaryotic Cell Cycle and Promote Infections." Front Cell Infect Microbiol **7**: 208.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler und B. Vogelstein (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." Cell **75**(4): 817-825.

- Escribano-Diaz, C., A. Orthwein, A. Fradet-Turcotte, M. Xing, J. T. Young, J. Tkac, M. A. Cook, A. P. Rosebrock, M. Munro, M. D. Canny, D. Xu und D. Durocher (2013). "A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice." Mol Cell **49**(5): 872-883.
- Essers, J., A. B. Houtsmuller, L. van Veelen, C. Paulusma, A. L. Nigg, A. Pastink, W. Vermeulen, J. H. Hoeijmakers und R. Kanaar (2002). "Nuclear dynamics of RAD52 group homologous recombination proteins in response to DNA damage." EMBO J **21**(8): 2030-2037.
- Feng, L. und J. Chen (2012). "The E3 ligase RNF8 regulates KU80 removal and NHEJ repair." Nat Struct Mol Biol **19**(2): 201-206.
- Ferretti, L. P., L. Lafranchi und A. A. Sartori (2013). "Controlling DNA-end resection: a new task for CDKs." Front Genet **4**: 99.
- Franken, N. A., H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman und C. van Bree (2006). "Clonogenic assay of cells in vitro." Nat Protoc **1**(5): 2315-2319.
- Frankenberg-Schwager, M. und D. Frankenberg (1990). "DNA double-strand breaks: their repair and relationship to cell killing in yeast." Int J Radiat Biol **58**(4): 569-575.
- Gartel, A. L. (2009). "p21(WAF1/CIP1) and cancer: a shifting paradigm?" Biofactors **35**(2): 161-164.
- Georgakilas, A. G., P. O'Neill und R. D. Stewart (2013). "Induction and repair of clustered DNA lesions: what do we know so far?" Radiat Res **180**(1): 100-109.
- Gerelchuluun, A., E. Manabe, T. Ishikawa, L. Sun, K. Itoh, T. Sakae, K. Suzuki, R. Hirayama, A. Asaithamby, D. J. Chen und K. Tsuboi (2015). "The major DNA repair pathway after both proton and carbon-ion radiation is NHEJ, but the HR pathway is more relevant in carbon ions." Radiat Res **183**(3): 345-356.
- Ghosal, G. und J. Chen (2013). "DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome." Transl Cancer Res **2**(3): 107-129.
- Gollapalle, E., R. Wang, R. Adetolu, D. Tsao, D. Francisco, G. Sigounas und A. G. Georgakilas (2007). "Detection of oxidative clustered DNA lesions in X-irradiated mouse skin tissues and human MCF-7 breast cancer cells." Radiat Res **167**(2): 207-216.
- Goodhead, D. T. (1994). "Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA." Int J Radiat Biol **65**(1): 7-17.
- Goodhead, D. T. (2006). "Energy deposition stochastics and track structure: what about the target?" Radiat Prot Dosimetry **122**(1-4): 3-15.
- Gulston, M., C. de Lara, T. Jenner, E. Davis und P. O'Neill (2004). "Processing of clustered DNA damage generates additional double-strand breaks in mammalian cells post-irradiation." Nucleic Acids Res **32**(4): 1602-1609.
- Hall und Giaccia (2006). "Radiobiology for the Radiologist." Lippincott Williams & Wilkins **6. Auflage**.
- Han, D., J. Liang, Y. Lu, L. Xu, S. Miao, L. Y. Lu, W. Song und L. Wang (2016). "Ubiquitylation of Rad51d Mediated by E3 Ligase Rnf138 Promotes the Homologous Recombination Repair Pathway." PLoS One **11**(5): e0155476.
- Harding, S. M., C. Coackley und R. G. Bristow (2011). "ATM-dependent phosphorylation of 53BP1 in response to genomic stress in oxic and hypoxic cells." Radiother Oncol **99**(3): 307-312.

- Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi und S. J. Elledge (1993). "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases." Cell **75**(4): 805-816.
- Herrmann, J., L. O. Lerman und A. Lerman (2007). "Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation." Circ Res **100**(9): 1276-1291.
- Hershko, A. und A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-479.
- Hoege, C., B. Pfander, G. L. Moldovan, G. Pyrowolakis und S. Jentsch (2002). "RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO." Nature **419**(6903): 135-141.
- Hu, Y., C. Wang, K. Huang, F. Xia, J. D. Parvin und N. Mondal (2014). "Regulation of 53BP1 protein stability by RNF8 and RNF168 is important for efficient DNA double-strand break repair." PLoS One **9**(10): e110522.
- Huang, F., O. M. Mazina, I. J. Zentner, S. Cocklin und A. V. Mazin (2012). "Inhibition of homologous recombination in human cells by targeting RAD51 recombinase." J Med Chem **55**(7): 3011-3020.
- Huang, T. T. und A. D. D'Andrea (2006). "Regulation of DNA repair by ubiquitylation." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(5): 323-334.
- Huen, M. S., R. Grant, I. Manke, K. Minn, X. Yu, M. B. Yaffe und J. Chen (2007). "RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly." Cell **131**(5): 901-914.
- Huertas, P. und S. P. Jackson (2009). "Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair." J Biol Chem **284**(14): 9558-9565.
- Iliakis, G. (1980). "Effects of beta-arabinofuranosyladenine on the growth and repair of potentially lethal damage in Ehrlich ascites tumor cells." Radiat Res **83**(3): 537-552.
- Iliakis, G. (2009). "Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: cell cycle dependence." Radiother Oncol **92**(3): 310-315.
- Iliakis, G., T. Murmann und A. Soni (2015). "Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications for the formation of chromosome translocations." Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen **793**: 166-175.
- Iliakis, G., H. Wang, A. R. Perrault, W. Boecker, B. Rosidi, F. Windhofer, W. Wu, J. Guan, G. Terzoudi und G. Pantelias (2004). "Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation." Cytogenet Genome Res **104**(1-4): 14-20.
- Ira, G., A. Pelliccioli, A. Balijja, X. Wang, S. Fiorani, W. Carotenuto, G. Liberi, D. Bressan, L. Wan, N. M. Hollingsworth, J. E. Haber und M. Foiani (2004). "DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1." Nature **431**(7011): 1011-1017.
- Ishida, N., T. Nakagawa, S. I. Iemura, A. Yasui, H. Shima, Y. Katoh, Y. Nagasawa, T. Natsume, K. Igarashi und K. Nakayama (2017). "Ubiquitylation of Ku80 by RNF126 Promotes Completion of Nonhomologous End Joining-Mediated DNA Repair." Mol Cell Biol **37**(4): e00347-00316.
- Ismail, I. H., J. P. Gagne, M. M. Genois, H. Strickfaden, D. McDonald, Z. Xu, G. G. Poirier, J. Y. Masson und M. J. Hendzel (2015). "The RNF138 E3 ligase displaces Ku to promote DNA end resection and regulate DNA repair pathway choice." Nat Cell Biol **17**(11): 1446-1457.
- Isono, M., A. Niimi, T. Oike, Y. Hagiwara, H. Sato, R. Sekine, Y. Yoshida, S. Y. Isobe, C. Obuse, R. Nishi, E. Petricci, S. Nakada, T. Nakano und A. Shibata (2017). "BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation." Cell Rep **18**(2): 520-532.

- Jackson, S. P. (2002). "Sensing and repairing DNA double-strand breaks." Carcinogenesis **23**(5): 687-696.
- Jackson, S. P. und J. Bartek (2009). "The DNA-damage response in human biology and disease." Nature **461**(7267): 1071-1078.
- Jakob, B., M. Scholz und G. Taucher-Scholz (2003). "Biological imaging of heavy charged-particle tracks." Radiat Res **159**(5): 676-684.
- Jansen, A. und K. J. Verstrepen (2011). "Nucleosome positioning in *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiol Mol Biol Rev **75**(2): 301-320.
- Jazayeri, A., J. Falck, C. Lukas, J. Bartek, G. C. Smith, J. Lukas und S. P. Jackson (2006). "ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks." Nat Cell Biol **8**(1): 37-45.
- Jeggo, P. und M. Löbrich (2006). "Radiation-induced DNA damage responses." Radiat Prot Dosimetry **122**(1-4): 124-127.
- Jeggo, P. und M. Löbrich (2015). "How cancer cells hijack DNA double-strand break repair pathways to gain genomic instability." Biochem J **471**(1): 1-11.
- Jeggo, P. A., V. Geuting und M. Löbrich (2011). "The role of homologous recombination in radiation-induced double-strand break repair." Radiother Oncol **101**(1): 7-12.
- Jeggo, P. A. und M. Löbrich (2017). "DNA non-homologous end-joining enters the resection arena." Oncotarget **8**(55): 93317-93318.
- Joiner, M. C., B. Marples, P. Lambin, S. C. Short und I. Turesson (2001). "Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms." Int J Radiat Oncol Biol Phys **49**(2): 379-389.
- Kaidi, A., B. T. Weinert, C. Choudhary und S. P. Jackson (2010). "Human SIRT6 promotes DNA end resection through CtIP deacetylation." Science **329**(5997): 1348-1353.
- Khanna, K. K. und S. P. Jackson (2001). "DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection." Nat Genet **27**(3): 247-254.
- Kim, J. E., K. Minter-Dykhouse und J. Chen (2006). "Signaling networks controlled by the MRN complex and MDC1 during early DNA damage responses." Mol Carcinog **45**(6): 403-408.
- Kim, S. T., D. S. Lim, C. E. Canman und M. B. Kastan (1999). "Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members." J Biol Chem **274**(53): 37538-37543.
- Komander, D. und M. Rape (2012). "The ubiquitin code." Annu Rev Biochem **81**: 203-229.
- Kotogany, E., D. Dudits, G. V. Horvath und F. Ayaydin (2010). "A rapid and robust assay for detection of S-phase cell cycle progression in plant cells and tissues by using ethynyl deoxyuridine." Plant Methods **6**(1): 5.
- Kraft, G. (1990). "The radiobiological and physical basis for radiotherapy with protons and heavier ions." Strahlenther Onkol **166**(1): 10-13.
- Kraft, G. (1998). "Radiotherapy with heavy ions: radiobiology, clinical indications and experience at GSI, Darmstadt." Tumori **84**(2): 200-204.
- Kramer, M., W. K. Weyrather und M. Scholz (2003). "The increased biological effectiveness of heavy charged particles: from radiobiology to treatment planning." Technol Cancer Res Treat **2**(5): 427-436.

- Krasner, D. S., J. M. Daley, P. Sung und H. Niu (2015). "Interplay between Ku and Replication Protein A in the Restriction of Exo1-mediated DNA Break End Resection." J Biol Chem **290**(30): 18806-18816.
- Krieger, H. (2017). "Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes." **5. Auflage**.
- Krogan, N. J., M. H. Lam, J. Fillingham, M. C. Keogh, M. Gebbia, J. Li, N. Datta, G. Cagney, S. Buratowski, A. Emili und J. F. Greenblatt (2004). "Proteasome involvement in the repair of DNA double-strand breaks." Mol Cell **16**(6): 1027-1034.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lafranchi, L., H. R. de Boer, E. G. de Vries, S. E. Ong, A. A. Sartori und M. A. van Vugt (2014). "APC/C(Cdh1) controls CtIP stability during the cell cycle and in response to DNA damage." EMBO J **33**(23): 2860-2879.
- Lambin, P., B. Marples, B. Fertil, E. P. Malaise und M. C. Joiner (1993). "Hypersensitivity of a human tumour cell line to very low radiation doses." Int J Radiat Biol **63**(5): 639-650.
- Lan, L., S. Nakajima, Y. Oohata, M. Takao, S. Okano, M. Masutani, S. H. Wilson und A. Yasui (2004). "In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(38): 13738-13743.
- Leahy, J. J., B. T. Golding, R. J. Griffin, I. R. Hardcastle, C. Richardson, L. Rigoreau und G. C. Smith (2004). "Identification of a highly potent and selective DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) inhibitor (NU7441) by screening of chromenone libraries." Bioorg Med Chem Lett **14**(24): 6083-6087.
- Lee, J. H. und T. T. Paull (2005). "ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex." Science **308**(5721): 551-554.
- Li, X. und W. D. Heyer (2008). "Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance." Cell Res **18**(1): 99-113.
- Lieber, M. R. (2010). "The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway." Annu Rev Biochem **79**: 181-211.
- Limbo, O., C. Chahwan, Y. Yamada, R. A. de Bruin, C. Wittenberg und P. Russell (2007). "Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination." Mol Cell **28**(1): 134-146.
- Lipkowitz, S. und A. M. Weissman (2011). "RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis." Nat Rev Cancer **11**(9): 629-643.
- Liu, T. und J. Huang (2016). "DNA End Resection: Facts and Mechanisms." Genomics Proteomics Bioinformatics **14**(3): 126-130.
- Löbrich, M. und P. Jeggo (2017). "A Process of Resection-Dependent Nonhomologous End Joining Involving the Goddess Artemis." Trends Biochem Sci **42**(9): 690-701.
- Löbrich, M., A. Shibata, A. Beucher, A. Fisher, M. Ensminger, A. A. Goodarzi, O. Barton und P. A. Jeggo (2010). "gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization." Cell Cycle **9**(4): 662-669.
- Longhese, M. P., D. Bonetti, N. Manfrini und M. Clerici (2010). "Mechanisms and regulation of DNA end resection." EMBO J **29**(17): 2864-2874.

- Lottersberger, F., A. Bothmer, D. F. Robbiani, M. C. Nussenzweig und T. de Lange (2013). "Role of 53BP1 oligomerization in regulating double-strand break repair." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(6): 2146-2151.
- Lou, Z., K. Minter-Dykhouse, S. Franco, M. Gostissa, M. A. Rivera, A. Celeste, J. P. Manis, J. van Deursen, A. Nussenzweig, T. T. Paull, F. W. Alt und J. Chen (2006). "MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals." Mol Cell **21**(2): 187-200.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
- Lucey, B. P., W. A. Nelson-Rees und G. M. Hutchins (2009). "Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination." Arch Pathol Lab Med **133**(9): 1463-1467.
- Lukas, C., V. Savic, S. Bekker-Jensen, C. Doil, B. Neumann, R. S. Pedersen, M. Grofte, K. L. Chan, I. D. Hickson, J. Bartek und J. Lukas (2011). "53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress." Nat Cell Biol **13**(3): 243-253.
- Ma, Y., U. Pannicke, K. Schwarz und M. R. Lieber (2002). "Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination." Cell **108**(6): 781-794.
- Magnaghi, P., R. D'Alessio, B. Valsasina, N. Avanzi, S. Rizzi, D. Asa, F. Gasparri, L. Cozzi, U. Cucchi, C. Orrenius, P. Polucci, D. Ballinari, C. Perrera, A. Leone, G. Cervi, E. Casale, Y. Xiao, C. Wong, D. J. Anderson, A. Galvani, D. Donati, T. O'Brien, P. K. Jackson und A. Isacchi (2013). "Covalent and allosteric inhibitors of the ATPase VCP/p97 induce cancer cell death." Nat Chem Biol **9**(9): 548-556.
- Maier, A., J. Wiedemann, J. A. Adrian, M. Dornhecker, A. Zipf, W. Kraft-Weyrather, G. Kraft, S. Richter, N. Teuscher und C. Fournier (2019). "alpha-Irradiation setup for primary human cell cultures." Int J Radiat Biol: 1-8.
- Mansour, W. Y., T. Rhein und J. Dahm-Daphi (2010). "The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies." Nucleic Acids Res **38**(18): 6065-6077.
- Matlashewski, G., L. Banks, D. Pim und L. Crawford (1986). "Analysis of human p53 proteins and mRNA levels in normal and transformed cells." Eur J Biochem **154**(3): 665-672.
- Matson, J. P. und J. G. Cook (2017). "Cell cycle proliferation decisions: the impact of single cell analyses." FEBS J **284**(3): 362-375.
- May, E., J. R. Jenkins und P. May (1991). "Endogenous HeLa p53 proteins are easily detected in HeLa cells transfected with mouse deletion mutant p53 gene." Oncogene **6**(8): 1363-1365.
- McVey, M. und S. E. Lee (2008). "MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings." Trends Genet **24**(11): 529-538.
- Mechali, M. und M. Lutzmann (2008). "The cell cycle: now live and in color." Cell **132**(3): 341-343.
- Meek, K., P. Douglas, X. Cui, Q. Ding und S. P. Lees-Miller (2007). "trans Autophosphorylation at DNA-dependent protein kinase's two major autophosphorylation site clusters facilitates end processing but not end joining." Mol Cell Biol **27**(10): 3881-3890.
- Meerang, M., D. Ritz, S. Paliwal, Z. Garajova, M. Bosshard, N. Mailand, P. Janscak, U. Hubscher, H. Meyer und K. Ramadan (2011). "The ubiquitin-selective segregase VCP/p97 orchestrates the response to DNA double-strand breaks." Nat Cell Biol **13**(11): 1376-1382.

- Mimitou, E. P. und L. S. Symington (2008). "Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing." Nature **455**(7214): 770-774.
- Mimitou, E. P. und L. S. Symington (2010). "Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2." EMBO J **29**(19): 3358-3369.
- Mimitou, E. P. und L. S. Symington (2011). "DNA end resection--unraveling the tail." DNA Repair (Amst) **10**(3): 344-348.
- Mirzayans, R., B. Andrais und D. Murray (2018). "Viability Assessment Following Anticancer Treatment Requires Single-Cell Visualization." Cancers (Basel) **10**(8).
- Mladenov, E. und G. Iliakis (2011). "Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways." Mutat Res **711**(1-2): 61-72.
- Mladenov, E., S. Magin, A. Soni und G. Iliakis (2013). "DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy." Front Oncol **3**: 113.
- Modesti, M. und R. Kanaar (2001). "Homologous recombination: from model organisms to human disease." Genome Biol **2**(5): REVIEWS1014.
- Nakada, S. (2016). "Opposing roles of RNF8/RNF168 and deubiquitinating enzymes in ubiquitination-dependent DNA double-strand break response signaling and DNA-repair pathway choice." J Radiat Res **57 Suppl 1**: i33-i40.
- Nakamura, K., T. Kogame, H. Oshiumi, A. Shinohara, Y. Sumitomo, K. Agama, Y. Pommier, K. M. Tsutsui, K. Tsutsui, E. Hartsuiker, T. Ogi, S. Takeda und Y. Taniguchi (2010). "Collaborative action of Brca1 and CtIP in elimination of covalent modifications from double-strand breaks to facilitate subsequent break repair." PLoS Genet **6**(1): e1000828.
- Newman, R. H. und J. Zhang (2008). "Fucci: street lights on the road to mitosis." Chem Biol **15**(2): 97-98.
- Niforou, K. M., A. K. Anagnostopoulos, K. Vougas, C. Kittas, V. G. Gorgoulis und G. T. Tsangaris (2008). "The proteome profile of the human osteosarcoma U2OS cell line." Cancer Genomics Proteomics **5**(1): 63-78.
- Nikfarjam, L. und P. Farzaneh (2012). "Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture." Cell J **13**(4): 203-212.
- Nowsheen, S. und E. S. Yang (2012). "The intersection between DNA damage response and cell death pathways." Exp Oncol **34**(3): 243-254.
- Olive, P. L. (1998). "The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation." Radiat Res **150**(5 Suppl): S42-51.
- Pagano, M., R. Pepperkok, F. Verde, W. Ansorge und G. Draetta (1992). "Cyclin A is required at two points in the human cell cycle." EMBO J **11**(3): 961-971.
- Panier, S. und S. J. Boulton (2014). "Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(1): 7-18.
- Pardo, B., B. Gomez-Gonzalez und A. Aguilera (2009). "DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship." Cell Mol Life Sci **66**(6): 1039-1056.
- Paudyal, S. C. und Z. You (2016). "Sharpening the ends for repair: mechanisms and regulation of DNA resection." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **48**(7): 647-657.

- Pawlik, T. M. und K. Keyomarsi (2004). "Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy." Int J Radiat Oncol Biol Phys **59**(4): 928-942.
- Pellegrini, L., D. S. Yu, T. Lo, S. Anand, M. Lee, T. L. Blundell und A. R. Venkitaraman (2002). "Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex." Nature **420**(6913): 287-293.
- Peterson, S. E., Y. Li, F. Wu-Baer, B. T. Chait, R. Baer, H. Yan, M. E. Gottesman und J. Gautier (2013). "Activation of DSB processing requires phosphorylation of CtIP by ATR." Mol Cell **49**(4): 657-667.
- Pirzio, L. M., M. A. Freulet-Marriere, Y. Bai, B. Fouladi, J. P. Murnane, L. Sabatier und C. Desmaze (2004). "Human fibroblasts expressing hTERT show remarkable karyotype stability even after exposure to ionizing radiation." Cytogenet Genome Res **104**(1-4): 87-94.
- Postow, L. (2011). "Destroying the ring: Freeing DNA from Ku with ubiquitin." FEBS Lett **585**(18): 2876-2882.
- Postow, L. und H. Funabiki (2013). "An SCF complex containing Fbx12 mediates DNA damage-induced Ku80 ubiquitylation." Cell Cycle **12**(4): 587-595.
- Postow, L., C. Ghenoïu, E. M. Woo, A. N. Krutchinsky, B. T. Chait und H. Funabiki (2008). "Ku80 removal from DNA through double strand break-induced ubiquitylation." J Cell Biol **182**(3): 467-479.
- Puck, T. T. und P. I. Marcus (1956). "Action of x-rays on mammalian cells." J Exp Med **103**(5): 653-666.
- Ran, F. A., P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A. Scott und F. Zhang (2013). "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system." Nat Protoc **8**(11): 2281-2308.
- Rassool, F. V. (2003). "DNA double strand breaks (DSB) and non-homologous end joining (NHEJ) pathways in human leukemia." Cancer Lett **193**(1): 1-9.
- Riballo, E., M. Kuhne, N. Rief, A. Doherty, G. C. Smith, M. J. Recio, C. Reis, K. Dahm, A. Fricke, A. Krempler, A. R. Parker, S. P. Jackson, A. Gennery, P. A. Jeggo und M. Löbrich (2004). "A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci." Mol Cell **16**(5): 715-724.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova und W. M. Bonner (1998). "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139." J Biol Chem **273**(10): 5858-5868.
- Rothkamm, K. und M. Löbrich (2003). "Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5057-5062.
- Rubio, M. A., S. H. Kim und J. Campisi (2002). "Reversible manipulation of telomerase expression and telomere length. Implications for the ionizing radiation response and replicative senescence of human cells." J Biol Chem **277**(32): 28609-28617.
- Sakaue-Sawano, A., H. Kurokawa, T. Morimura, A. Hanyu, H. Hama, H. Osawa, S. Kashiwagi, K. Fukami, T. Miyata, H. Miyoshi, T. Imamura, M. Ogawa, H. Masai und A. Miyawaki (2008). "Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression." Cell **132**(3): 487-498.
- Salic, A. und T. J. Mitchison (2008). "A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(7): 2415-2420.
- Sartori, A. A., C. Lukas, J. Coates, M. Mistrik, S. Fu, J. Bartek, R. Baer, J. Lukas und S. P. Jackson (2007). "Human CtIP promotes DNA end resection." Nature **450**(7169): 509-514.

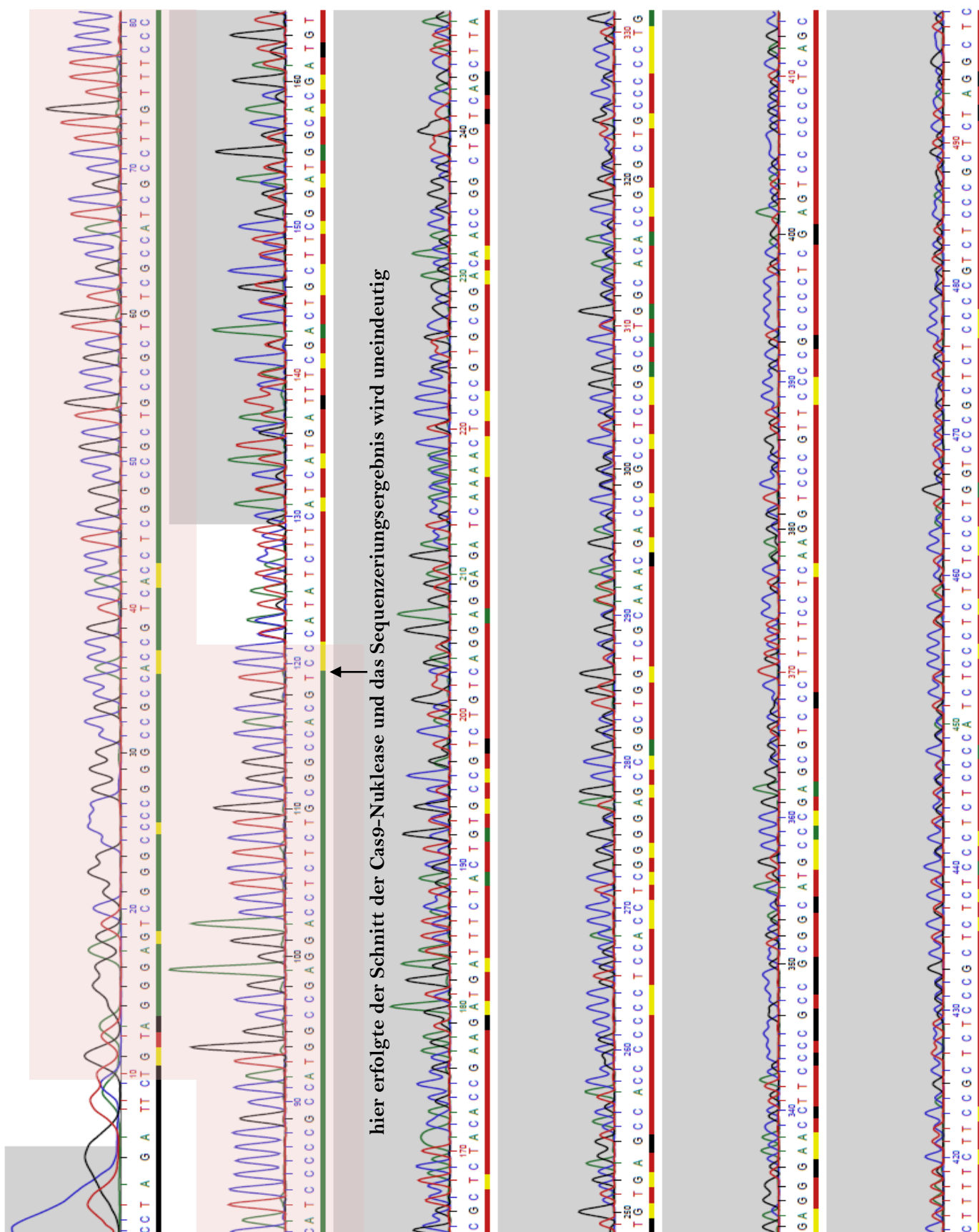
- Schmidt, C. K., Y. Galanty, M. Sczaniecka-Clift, J. Coates, S. Jhujh, M. Demir, M. Cornwell, P. Beli und S. P. Jackson (2015). "Systematic E2 screening reveals a UBE2D-RNF138-CtIP axis promoting DNA repair." Nat Cell Biol **17**(11): 1458-1470.
- Shao, Z., A. J. Davis, K. R. Fattah, S. So, J. Sun, K. J. Lee, L. Harrison, J. Yang und D. J. Chen (2012). "Persistently bound Ku at DNA ends attenuates DNA end resection and homologous recombination." DNA Repair (Amst) **11**(3): 310-316.
- Shechter, D., V. Costanzo und J. Gautier (2004). "ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing." Nat Cell Biol **6**(7): 648-655.
- Shibata, A. (2017). "Regulation of repair pathway choice at two-ended DNA double-strand breaks." Mutat Res **803-805**: 51-55.
- Shibata, A., S. Conrad, J. Birraux, V. Geuting, O. Barton, A. Ismail, A. Kakarougkas, K. Meek, G. Taucher-Scholz, M. Löbrich und P. A. Jeggo (2011). "Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase." EMBO J **30**(6): 1079-1092.
- Shim, E. Y., W. H. Chung, M. L. Nicolette, Y. Zhang, M. Davis, Z. Zhu, T. T. Paull, G. Ira und S. E. Lee (2010). "Saccharomyces cerevisiae Mre11/Rad50/Xrs2 and Ku proteins regulate association of Exo1 and Dna2 with DNA breaks." EMBO J **29**(19): 3370-3380.
- Short, S. C., J. Kelly, C. R. Mayes, M. Woodcock und M. C. Joiner (2001). "Low-dose hypersensitivity after fractionated low-dose irradiation in vitro." Int J Radiat Biol **77**(6): 655-664.
- Sinclair, W. K. (1968). "Cyclic x-ray responses in mammalian cells in vitro." Radiat Res **33**(3): 620-643.
- Smith, G. C. und S. P. Jackson (1999). "The DNA-dependent protein kinase." Genes Dev **13**(8): 916-934.
- Splinter, J., B. Jakob, M. Lang, K. Yano, J. Engelhardt, S. W. Hell, D. J. Chen, M. Durante und G. Taucher-Scholz (2010). "Biological dose estimation of UVA laser microirradiation utilizing charged particle-induced protein foci." Mutagenesis **25**(3): 289-297.
- Starita, L. M. und J. D. Parvin (2003). "The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair." Curr Opin Cell Biol **15**(3): 345-350.
- Stavnezer, J., J. E. Guikema und C. E. Schrader (2008). "Mechanism and regulation of class switch recombination." Annu Rev Immunol **26**: 261-292.
- Stewart, G. S., S. Panier, K. Townsend, A. K. Al-Hakim, N. K. Kolas, E. S. Miller, S. Nakada, J. Ylanko, S. Olivarius, M. Mendez, C. Oldreive, J. Wildenhain, A. Tagliaferro, L. Pelletier, N. Taubenheim, A. Durandy, P. J. Byrd, T. Stankovic, A. M. Taylor und D. Durocher (2009). "The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage." Cell **136**(3): 420-434.
- Stolz, A., W. Hilt, A. Buchberger und D. H. Wolf (2011). "Cdc48: a power machine in protein degradation." Trends Biochem Sci **36**(10): 515-523.
- Stucki, M., J. A. Clapperton, D. Mohammad, M. B. Yaffe, S. J. Smerdon und S. P. Jackson (2005). "MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks." Cell **123**(7): 1213-1226.
- Sutherland, B. M., P. V. Bennett, H. Schenk, O. Sidorkina, J. Laval, J. Trunk, D. Monteleone und J. Sutherland (2001). "Clustered DNA damages induced by high and low LET radiation, including heavy ions." Phys Med **17 Suppl 1**: 202-204.

- Sutherland, B. M., P. V. Bennett, O. Sidorkina und J. Laval (2000). "Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(1): 103-108.
- Sutherland, B. M., P. V. Bennett, J. C. Sutherland und J. Laval (2002). "Clustered DNA damages induced by x rays in human cells." Radiat Res **157**(6): 611-616.
- Symington, L. S. (2016). "Mechanism and regulation of DNA end resection in eukaryotes." Crit Rev Biochem Mol Biol **51**(3): 195-212.
- Symington, L. S. und J. Gautier (2011). "Double-strand break end resection and repair pathway choice." Annu Rev Genet **45**: 247-271.
- Tavecchio, M., J. M. Munck, C. Cano, D. R. Newell und N. J. Curtin (2012). "Further characterisation of the cellular activity of the DNA-PK inhibitor, NU7441, reveals potential cross-talk with homologous recombination." Cancer Chemother Pharmacol **69**(1): 155-164.
- Thompson, L. H. (2012). "Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography." Mutat Res **751**(2): 158-246.
- Ting, N. S., Y. Yu, B. Pohorelic, S. P. Lees-Miller und T. L. Beattie (2005). "Human Ku70/80 interacts directly with hTR, the RNA component of human telomerase." Nucleic Acids Res **33**(7): 2090-2098.
- Tomimatsu, N., B. Mukherjee, M. Catherine Hardebeck, M. Ilcheva, C. Vanessa Camacho, J. Louise Harris, M. Porteus, B. Llorente, K. K. Khanna und S. Burma (2014). "Phosphorylation of EXO1 by CDKs 1 and 2 regulates DNA end resection and repair pathway choice." Nat Commun **5**: 3561.
- Tomita, K., A. Matsuura, T. Caspari, A. M. Carr, Y. Akamatsu, H. Iwasaki, K. Mizuno, K. Ohta, M. Uritani, T. Ushimaru, K. Yoshinaga und M. Ueno (2003). "Competition between the Rad50 complex and the Ku heterodimer reveals a role for Exo1 in processing double-strand breaks but not telomeres." Mol Cell Biol **23**(15): 5186-5197.
- Tommasino, F., T. Friedrich, U. Scholz, G. Taucher-Scholz, M. Durante und M. Scholz (2013). "A DNA double-strand break kinetic rejoining model based on the local effect model." Radiat Res **180**(5): 524-538.
- Truong, L. N., Y. Li, L. Z. Shi, P. Y. Hwang, J. He, H. Wang, N. Razavian, M. W. Berns und X. Wu (2013). "Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(19): 7720-7725.
- Tsuchida, E., A. Kaida, E. Pratama, M. A. Ikeda, K. Suzuki, K. Harada und M. Miura (2015). "Effect of X-Irradiation at Different Stages in the Cell Cycle on Individual Cell-Based Kinetics in an Asynchronous Cell Population." PLoS One **10**(6): e0128090.
- Ulrich, H. D. und S. Jentsch (2000). "Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair." EMBO J **19**(13): 3388-3397.
- Unk, I., I. Hajdu, K. Fatyol, J. Hurwitz, J. H. Yoon, L. Prakash, S. Prakash und L. Haracska (2008). "Human HLTF functions as a ubiquitin ligase for proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(10): 3768-3773.
- van Attikum, H. und S. M. Gasser (2009). "Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response." Trends Cell Biol **19**(5): 207-217.

- van den Boom, J., M. Wolf, L. Weimann, N. Schulze, F. Li, F. Kaschani, A. Riemer, C. Zierhut, M. Kaiser, G. Iliakis, H. Funabiki und H. Meyer (2016). "VCP/p97 Extracts Sterically Trapped Ku70/80 Rings from DNA in Double-Strand Break Repair." Mol Cell **64**(1): 189-198.
- Veitch, N. C. (2004). "Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme." Phytochemistry **65**(3): 249-259.
- Walker, J. R., R. A. Corpina und J. Goldberg (2001). "Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair." Nature **412**(6847): 607-614.
- Wang, H., Z. Qiu, B. Liu, Y. Wu, J. Ren, Y. Liu, Y. Zhao, Y. Wang, S. Hao, Z. Li, B. Peng und X. Xu (2018). "PLK1 targets CtIP to promote microhomology-mediated end joining." Nucleic Acids Res **46**(20): 10724-10739.
- Wang, H., L. Z. Shi, C. C. Wong, X. Han, P. Y. Hwang, L. N. Truong, Q. Zhu, Z. Shao, D. J. Chen, M. W. Berns, J. R. Yates, 3rd, L. Chen und X. Wu (2013). "The interaction of CtIP and Nbs1 connects CDK and ATM to regulate HR-mediated double-strand break repair." PLoS Genet **9**(2): e1003277.
- Wang, H., X. Wang, P. Zhang und Y. Wang (2008). "The Ku-dependent non-homologous end-joining but not other repair pathway is inhibited by high linear energy transfer ionizing radiation." DNA Repair (Amst) **7**(5): 725-733.
- Wang, M., W. Wu, W. Wu, B. Rosidi, L. Zhang, H. Wang und G. Iliakis (2006). "PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways." Nucleic Acids Res **34**(21): 6170-6182.
- Wang, Q., T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless und M. G. Finn (2003). "Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne $[3 + 2]$ cycloaddition." J Am Chem Soc **125**(11): 3192-3193.
- Ward, J. F. (1975). "Radiation-induced strand breakage in DNA." Basic Life Sci **5B**: 471-472.
- Ward, J. F. (1988). "DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **35**: 95-125.
- Ward, J. F. (1994). "The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences." Int J Radiat Biol **66**(5): 427-432.
- West, S. C. (2003). "Molecular views of recombination proteins and their control." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(6): 435-445.
- Weterings, E. und D. J. Chen (2007). "DNA-dependent protein kinase in nonhomologous end joining: a lock with multiple keys?" J Cell Biol **179**(2): 183-186.
- Weyrather, W. K., S. Ritter, M. Scholz und G. Kraft (1999). "RBE for carbon track-segment irradiation in cell lines of differing repair capacity." Int J Radiat Biol **75**(11): 1357-1364.
- Williams, E. S., J. Stap, J. Essers, B. Ponnaiya, M. S. Luijsterburg, P. M. Krawczyk, R. L. Ullrich, J. A. Aten und S. M. Bailey (2007). "DNA double-strand breaks are not sufficient to initiate recruitment of TRF2." Nat Genet **39**(6): 696-698; author reply 698-699.
- Willmore, E., S. L. Elliott, T. Mainou-Fowler, G. P. Summerfield, G. H. Jackson, F. O'Neill, C. Lowe, A. Carter, R. Harris, A. R. Pettitt, C. Cano-Soumillac, R. J. Griffin, I. G. Cowell, C. A. Austin und B. W. Durkacz (2008). "DNA-dependent protein kinase is a therapeutic target and an indicator of poor prognosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia." Clin Cancer Res **14**(12): 3984-3992.

- Wood, R. D. und S. Doublie (2016). "DNA polymerase theta (POLQ), double-strand break repair, and cancer." DNA Repair (Amst) **44**: 22-32.
- Xie, Y. (2010). "Structure, assembly and homeostatic regulation of the 26S proteasome." J Mol Cell Biol **2**(6): 308-317.
- Xu, G. und S. R. Jaffrey (2013). "Proteomic identification of protein ubiquitination events." Biotechnol Genet Eng Rev **29**: 73-109.
- Xu, L., Y. Lu, D. Han, R. Yao, H. Wang, S. Zhong, Y. Luo, R. Han, K. Li, J. Fu, S. Zong, S. Miao, W. Song und L. Wang (2017). "Rnf138 deficiency promotes apoptosis of spermatogonia in juvenile male mice." Cell Death Dis **8**(5): e2795.
- Yajima, H., H. Fujisawa, N. I. Nakajima, H. Hirakawa, P. A. Jeggo, R. Okayasu und A. Fujimori (2013). "The complexity of DNA double strand breaks is a critical factor enhancing end-resection." DNA Repair (Amst) **12**(11): 936-946.
- Yao, G. (2014). "Modelling mammalian cellular quiescence." Interface Focus **4**(3): 20130074.
- Yard, B. D., N. M. Reilly, M. K. Bedenbaugh und D. L. Pittman (2016). "RNF138 interacts with RAD51D and is required for DNA interstrand crosslink repair and maintaining chromosome integrity." DNA Repair (Amst) **42**: 82-93.
- You, Z. und J. M. Bailis (2010). "DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints." Trends Cell Biol **20**(7): 402-409.
- You, Z., L. Z. Shi, Q. Zhu, P. Wu, Y. W. Zhang, A. Basilio, N. Tonnu, I. M. Verma, M. W. Berns und T. Hunter (2009). "CtIP links DNA double-strand break sensing to resection." Mol Cell **36**(6): 954-969.
- Yu, X. und J. Chen (2004). "DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains." Mol Cell Biol **24**(21): 9478-9486.
- Yu, X., S. Fu, M. Lai, R. Baer und J. Chen (2006). "BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP." Genes Dev **20**(13): 1721-1726.
- Zan, H., A. Komori, Z. Li, A. Cerutti, A. Schaffer, M. F. Flajnik, M. Diaz und P. Casali (2001). "The translesion DNA polymerase zeta plays a major role in Ig and bcl-6 somatic hypermutation." Immunity **14**(5): 643-653.
- Zimmermann, M., F. Lottersberger, S. B. Buonomo, A. Sfeir und T. de Lange (2013). "53BP1 regulates DSB repair using Rif1 to control 5' end resection." Science **339**(6120): 700-704.

Anhang 2: Sequenzierungsergebnis Hela.S-Fucci-RNF138-KO Klon 2C4



Anhang 3: Sequenzierergebnis RNF138-FLAG-Plasmid

mit Seq_1 = zu erwartende Sequenz nach Umklonierung und Seq_2 = Resultat des Sequenzierergebnisses

Seq_1	1	GCGGTTTGACTCACGGGGATTTC-C-AAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTG	58
Seq_2	1	-----CGTAAGGTCTG-----GGGAGTTTG	20
Seq_1	59	TTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACG	118
Seq_2	21	TTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACG	80
CMV Promotor			
Seq_1	119	CAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAAC	178
Seq_2	81	CAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAAC	140
FLAG-Sequenz			
Seq_1	179	CGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGTCGCCACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGT	238
Seq_2	141	CGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGTCGCCACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGT	200
RNF138-Sequenz			
Seq_1	239	CCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGaattCTATGGCCGAGGACCTCTCTGCGGCCA	298
Seq_2	201	CCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCTATGGCCGAGGACCTCTCTGCGGCCA	260
Seq_1	299	CGTCCTACACCGAAGATGATTTCTACTGCCCCGTCTGTCAGGAGGTGCTCAAAACGCCCCG	358
Seq_2	261	CGTCCTACACCGAAGATGATTTCTACTGCCCCGTCTGTCAGGAGGTGCTCAAAACGCCCCG	320
Seq_1	359	TGCGGACCACGGCCTGTCAGCACGTTTTCTGTAGAAAATGTTTCTGACTGCAATGAGGG	418
Seq_2	321	TGCGGACCACGGCCTGTCAGCACGTTTTCTGTAGAAAATGTTTCTGACTGCAATGAGGG	380
Seq_1	419	AAAGCGGAGCACATTGTCCCCTATGTCGTGAAATGTGACTAGAAGAGAGAGAGCATGTC	478
Seq_2	381	AAAGCGGAGCACATTGTCCCCTATGTCGTGAAATGTGACTAGAAGAGAGAGAGCATGTC	440
Seq_1	479	CTGAACGGGCCTTAGACCTTGAAAATATAATGAGGAAGTTTCTGGTAGCTGCAGATGCT	538
Seq_2	441	CTGAACGGGCCTTAGACCTTGAAAATATAATGAGGAAGTTTCTGGTAGCTGCAGATGCT	500
Seq_1	539	GTGCAAAACAGATTAAATTCTATCGCATGAGACATCATTACAAATCTTGTAAGAAGTATC	598
Seq_2	501	GTGCAAAACAGATTAAATTCTATCGCATGAGACATCATTACAAATCTTGTAAGAAGTATC	560
Seq_1	599	AGGATGAATATGGTGTTTCTTCTATCATTCCAAACCTTCAGATCTCTCAAGATTCAGTAG	658
Seq_2	561	AGGATGAATATGGTGTTTCTTCTATCATTCCAAACCTTCAGATCTCTCAAGATTCAGTAG	620

Seq_1	659	GGAACAGCAATAGGAGTGAAACATCCACATCTGATAACACAGAACTTACCAAGAGAATA	718
Seq_2	621	GGAACAGCAATAGGAGTGAAACATCCACATCTGATAACACAGAACTTACCAAGAGAATA	680
Seq_1	719	CAAGTCTTCTGGTCATCCTACTTTTAAGTGTCCTGTGTCAAGAATCAAATTTTACCA	778
Seq_2	681	CAAGTCTTCTGGTCATCCTACTTTTAAGTGTCCTGTGTCAAGAATCAAATTTTACCA	740
Seq_1	779	GACAGCGTTTACTGGATCACTGTAACAGTAATCACCTATTTAGATAGTTCCTGTGACAT	838
Seq_2	741	GACAGCGTTTACTGGATCACTGTAACAGTAATCACCTATTTAGATAGTTCCTGTGACAT	800
Seq_1	839	GTCCTATTTGTGTGTCTCTTCCTTGGGGAGATCCTAGCCAGATTACCAGAAATTTTCGTTA	898
Seq_2	801	GTCCTATTTGTGTGTCTCTTCCTTGGGGAGATCCTAGCCAGATTACCAGAAATTTTCGTTA	860
Seq_1	899	GTCATCTAAATCAGAGACATCAATTTGATTATGGAGAATTTGTGAATCTTCAGCTAGATG	958
Seq_2	861	GTCATCTAAATCAGAGACATCAATTTGATTATGGAGAATTTGTGAATCTTCAGCTAGATG	920
Seq_1	959	AAGAAACCCAATACCAAAGTCTGTTGAAGAATCTTTTCAAGTAAACATCTGAGCTGCAG	1018
Seq_2	921	AAGAAACCCAATACCAAAGTCTGTTGAAGAATCTTTTCAAGTAAACATCTGA-----A-	974
Seq_1	1019	TCGACGGTACCGCGGGCCCGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATA	1078
Seq_2	975	TCGACGGTACCGCGGGCCCGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCTTAATCCGCCCTA	1034
Seq_1	1079	CCACATTTGTAGAGGTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGA	1138
Seq_2	1035	CCACATTTGTGAAAGGTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCAACCTCCCCCTGAA-----	1089
Seq_1	1139	AACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACA	1198
Seq_2	1090	-----	1089

6.2. Lebenslauf

Name: Carina Janine Barent
Geburtstag: 30.07.1990
Geburtsort: Speyer
Staatsangehörigkeit: deutsch

Akademische Laufbahn:

Seit Juni 2016

PhD Studium am GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung Darmstadt und der Technischen Universität Darmstadt zum Thema: Relevanz der Ubiquitinierung für die Resektionsregulation in G1-Phase-Zellen an schwerioneninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen

März 2014 – Mai 2016

Masterstudium der Technischen Biologie an der Technischen Universität Darmstadt (M. Sc.); Masterthesis am GSI- Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung: Untersuchungen zum Einfluss der Polymerase θ auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in Abhängigkeit des Zellzyklus und der Schadenskomplexität

Oktober 2010 – März 2014

Bachelor der Biotechnologie an der Hochschule Darmstadt (B. Sc.); Bachelorthesis: Einfluss naher Infrarotstrahlung auf dreidimensionale Zellkulturen einer humanen Tumorzelllinie

Praktika

2015 Mai – Juli

Forschungspraktikum im Rahmen des Masterstudiums am GSI- Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung

2011 Juli – August

Semesterferienjob als Laborhilfe bei der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt Speyer (LUFA)

2010 Mai – Juli Praktikum zur Studiumsvorbereitung bei der DIARECT AG, Freiburg

Schulbildung:

2010 März Abitur – Allgemeine Hochschulreife
2001 – 2010 Hans-Purrmann-Gymnasium Speyer
1997 – 2001 Grundschule Dudenhofen

6.3. Publikationen und Tagungsbeiträge

6.3.1. GSI Annual Reports:

Barent, C., Becker, G., Taucher-Scholz G. and Averbeck N.B. (2016) „Polymerase θ plays no crucial role in the repair of heavy-ion-induced complex DNA double-strand breaks“ *GSI Scientific Report 2016*

Barent C., Niederreiter L., Pack L., Heselich A., Jakob B., Taucher-Scholz G. and Averbeck N. (2017) „RNF138 stimulates DNA-end resection upon heavy-ion-irradiation in human G1-phase cells“ *GSI Scientific Report 2017*

Barent C., Pack L., Heselich A., Jakob B., Taucher-Scholz G. and Averbeck N. B. (2018) „DNA end resection is decreased in RNF138 *Knockout* cells upon irradiation“ *GSI Scientific Report 2018*

6.3.2. Tagungsbeiträge

C. Barent, G. Taucher-Scholz and N. Averbeck. Polymerase θ plays no crucial role in the repair of heavy-ion-induced complex DNA double-strand breaks. *GBS, 19th Annual Meeting 26th-28th September 2016 in Erlangen, Poster Presentation*

C. Barent, L. Niederreiter, A. Heselich, B. Jakob, G. Taucher-Scholz and N. Averbeck. RNF138 stimulates resection upon heavy-ion irradiation in human G1-phase cells. *GBS, 20th Annual Meeting 17th-21st September 2017 in Essen, Poster Presentation*

C. Barent, L. Pack, B. Jakob, G. Taucher-Scholz and N. Averbeck. RNF138 stimulates resection of complex DNA double-strand breaks in human G1-phase cells. *64th Annual Meeting of the Radiation Research Society September 23rd-26th, 2018 in Chicago. Poster in Poster Session PS2-16 DNA - Oxidative Damage Responses & Physico-Chemistry*

Barent, C., Jakob, B., Taucher-Scholz, G. and Averbeck N.B. RNF138 stimulates DNA end resection upon heavy ion irradiation in human G1-phase cells. *GBS, 21st Annual Meeting 17th-19th September 2018 in Frankfurt, Proffered Paper Presentation DNA 05*

6.3.3. Auszeichnungen

Scholars-in-Training (SIT) Reisestipendium zur Teilnahme am Radiation Research Society Annual Meeting 2018 in Chicago, USA

Reisestipendium zur Teilnahme an der GBS Jahrestagung 2018 in Frankfurt

6.4. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Markus Löbrich für die freundliche Übernahme des Erstgutachtens meiner Dissertation, die Aufnahme ins Graduiertenkolleg und für die in diesem Zusammenhang entstandenen stundenlangen, aufregenden Diskussionen, kritischen Hinterfragungen und guten Ideen für meine Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Gisela Taucher-Scholz für die Übernahme des Korreferats dieser Arbeit, die gute Zusammenarbeit in den letzten Jahren, die stets offene Tür, unerschöpfliche Diskussionsbereitschaft und hilfreichen Ratschläge, Kommentare sowie Anregungen für meine Arbeit.

Ich danke Prof. Dr. Bodo Laube und Dr. Tobias Meckel für ihre Bereitschaft als Prüfer meiner Arbeit zu agieren.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Nicole Averbeck für die Bereitstellung des interessanten Themas meiner Dissertation, die tolle Zusammenarbeit, exzellente Betreuung während meiner gesamten Zeit an der GSI und für ihre selbstverständliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Danke zudem für das Korrekturlesen und deine Motivation durch dein unentwegt positives Denken und deine positive Einstellung.

Des Weiteren möchte ich Dr. Burkhard Jakob und allen aktuellen sowie ehemaligen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe an der GSI für das gute Arbeitsklima, den Zusammenhalt, die Unterstützung und Hilfsbereitschaft danken. Danke vor allem an Gudrun und Lotta für die tägliche Hilfe im Laboralltag. Mit euch hat die Arbeit immer Spaß gemacht. Vielen Dank auch an alle Mitarbeiter der Abteilung Biophysik, die mich insbesondere während Strahlzeiten unermüdlich unterstützt haben.

Danke an Ellen, Celine, Bahar, Antonia, Tabea, Kim, Lisa, Christoph, Martin, Susanne, David, Franziska, Maik, Milana, Alina, Sera, Timo usw. für die abwechslungsreichen und teilweise albernsten Diskussions Themen während unserer gemeinsamen Mittags- und Kaffeepausen und das ein oder andere aufbauende Wort zur Zeit der Erstellung dieser Arbeit.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben, und meiner ganzen Familie für den Rückhalt, den ihr mir gebt. Vielen Dank für die lebenslange, uneingeschränkte Unterstützung, Liebe und Verständnis sowie die unbezahlbaren Ratschläge in jeder Lebenssituation.

Last but not least, danke an meine langjährigen Freundinnen Vivi, Katrin, Saskia, Michi, Melanie und Lisa, die zu jeder Zeit ein offenes Ohr für mich hatten, bei denen ich in meiner Freizeit abschalten und die Arbeit Arbeit sein lassen konnte. Insbesondere danke ich Julia für die wunderschöne, gemeinsame Zeit in Mainz, für deine aufbauenden Worte, deinen festen Glauben an mich, die vielen lustigen, unvergesslichen Momente, und dafür, dass du einfach immer für mich da warst. Danke, dass ich bei euch so sein kann, wie ich bin!

Nichts auf dieser Welt ist so wertvoll wie wahre Freundschaft.

– Thomas von Aquin –



Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den